

Filière Technologies du vivant

Orientation Chimie analytique

Diplôme 2007

Joëlle Quiquerez

*Développement d'une méthode
pour le dosage de l'hydrazine
dans le Carbidopa*

Professeur

Urban Frey

Expert

Ezzeddine Ben-Rayana


SI	TV	EE	IG	EST
X	X	X	X	

Filière / Studiengang : Technologies du vivant

Confidentiel / Vertraulich ☐

Etudiant / Student Joëlle Quiquerez	Année scolaire / Schuljahr 2006/07	No TD / Nr. DA TV/2007/77
Proposé par / vorgeschlagen von Sochinaz SA Rte du Simplon 22 1895 Vionnaz E. Ben-Rayana		Lieu d'exécution / Ausführungsort HES—SO Valais, DSI Sochinaz, Evionnaz Expert / Experte E. Ben-Rayana

Titre / Titel: Développement de méthode pour le dosage de l'hydrazine dans le Carbidopa
Description / Beschreibung: <p>La pharmacopée européenne exige la recherche de l'hydrazine dans le carbidopa. La méthode proposée ne permet pas de différencier l'hydrazine résiduelle de l'hydrazine résultant de la dégradation du carbidopa en solution.</p> <p>Le but de ce travail est de trouver le moyen de différencier l'hydrazine résiduelle dans le carbidopa produit par Sochinaz et l'hydrazine formée en solution. Il s'agit par conséquent de mettre au point une technique analytique de quantification de l'hydrazine résiduelle dans le carbidopa et de valider cette méthode selon les guidelines de l'ICH pour les substances apparentées/impuretés.</p>
Objectifs / Ziele: <ul style="list-style-type: none"> — Développer une méthode pour la quantification de l'hydrazine dans le carbidopa. — Valider — selon l'ICH — la méthode de quantification de l'hydrazine dans le carbidopa. — Inclure cette méthode comme un test de routine, dans la perspective d'évaluer la pureté du carbidopa produit par la Société Sochinaz.

Signature ou visa / Unterschrift oder Visum Resp. de l'orientation chimie analytique  Professeur/Dozent: Urban Frey  Etudiant/Student: 	Délais / Termine Attribution du thème / Ausgabe des Auftrags: 03.09.2007 Remise du rapport / Abgabe des Schlussberichts: 23.11.2007 — 12h00 Exposition publique / Ausstellung Diplomarbeiten: 30.11.2007 Défenses orales / Mündliche Verfechtungen Semaine 49
--	--

Développement d'une méthode pour le dosage de l'hydrazine dans le Carbidopa
Entwicklung einer Methode um Hydrazin im Carbidopa zu quantifizieren

Résumé

Le but de ce travail était de mettre au point une méthode de quantification de l'hydrazine dans la carbidopa.

La carbidopa, en association avec la lévodopa, permet de lutter contre la maladie de Parkinson. Les échantillons de carbidopa sont susceptibles de contenir une impureté, l'hydrazine, qui serait un résidu de synthèse ou un produit de dégradation. L'hydrazine étant toxique et carcinogène et la limite de la teneur en hydrazine dans la carbidopa fixée par la Pharmacopée Européenne est de 20 ppm.

Pour quantifier l'hydrazine, une dérivatisation est nécessaire. Cependant, lors de la dérivatisation, la carbidopa se dégrade et forme de l'hydrazine supplémentaire.

Pour éviter ce phénomène, la carbidopa est extraite, avant la dérivatisation, à l'aide d'une cartouche renfermant une résine échangeuse d'anions. Le filtrat contenant l'hydrazine est tout d'abord dérivatisé avec la benzaldéhyde pour former la benzalazine. Celle-ci est extraite avec de l'heptane pour être ensuite quantifiée par HPLC-UV.

Cette méthode a été validée selon les normes ICH et présente une linéarité, une fidélité et une exactitude satisfaisante. Toutefois, la répétabilité intermédiaire pourrait être améliorée par l'utilisation d'une chambre à vide permettant à la solution de traverser la résine d'une manière régulière à travers la cartouche.

Mots clés

Carbidopa, hydrazine, benzalazine, dérivatisation, résine échangeuse d'anions, HPLC-UV, validation

Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war eine Quantifizierungsmethode für Hydrazin im Carbidopa zu entwickeln.

Carbidopa wird als Arzneistoff in Verbindung mit Levodopa zur Therapie der Parkinson-Krankheit eingesetzt. Es beinhaltet als Syntheserückstand eine Unreinheit; das Hydrazin. Da diese Substanz toxisch und karzinogen ist, wurde von der Europäischen Pharmakopöe die Grenze des Hydrazingehaltes im Carbidopa auf 20 ppm festgelegt.

Um das Hydrazin zu quantifizieren ist eine Derivatisierung nötig. Diese baut jedoch das Carbidopa ab, was zur Bildung von zusätzlichem Hydrazin führt.

Um dies zu verhindern wird das Carbidopa vor der Derivatisierung mit Hilfe einer Anionentauscherharz enthaltenden Kartusche extrahiert.

Das Filtrat mit dem Hydrazin wird zuerst mit Benzaldehyd derivatisiert, was zur Bildung von Benzalazin führt. Dieses wird mit Heptan extrahiert und anschliessend mittels HPLC-UV quantifiziert.

Diese Methode wurde nach den ICH-Normen validiert und weist eine befriedigende Linearität, Genauigkeit und Präzision auf. Die Reproduzierbarkeit könnte hingegen durch die Verwendung eines Vakuums, welches die Lösung gleichmässiger durch das Harz fließen lässt, verbessert werden.

Schlüsselwörter

Carbidopa, Hydrazin, Benzalanin, Derivatisierung, Anionentauscherharz, HPLC-UV, Validierung

Table des matières

1. INTRODUCTION	5
1.1. La carbidopa et la maladie de Parkinson	5
1.2. L'hydrazine et sa dérivatisation	6
1.3. Quantification de l'hydrazine	7
1.4. La carbidopa et sa dégradation	8
1.5. Résine échangeuse d'ions	8
1.6. La validation	11
1.6.1. La spécificité	11
1.6.2. La fidélité	12
1.6.3. L'exactitude	12
1.6.4. La limite de détection	12
1.6.5. La limite de quantification	12
1.6.6. La linéarité	12
1.6.7. L'intervalle	12
2. MATERIEL ET METHODES	13
2.1. Réactifs	13
2.2. Matériel et appareillage	14
2.3. Méthodes	14
2.3.1. Préparation de la solution de carbidopa	14
2.3.2. Préparation des solutions standards	14
2.3.3. Extraction sur résine en batch	15
2.3.4. Extraction sur résine Alltech IC-OH	16
2.3.5. Optimisation du débit sur la cartouche Alltech IC-OH	16
2.3.6. Optimisation du pH nécessaire à la dérivatisation	16
2.3.7. Optimisation du temps de dérivatisation	17
2.3.8. Optimisation du temps d'extraction	17
2.3.9. Méthode HPLC pour analyse de la carbidopa	17
2.3.10. Méthode HPLC pour l'analyse de l'hydrazine	17
2.3.11. Synthèse de la carbidopa dérivatisée	18
2.3.12. Analyse RMN	18
2.3.13. La validation	18
3. RESULTATS	21
3.1. Stabilité de la carbidopa en solution	21
3.2. Extraction sur résine	21
3.2.1. Extraction de la carbidopa sur résine, en mode batch	21
3.2.2. Extraction de la carbidopa sur cartouches de résine	25
3.3. La dérivatisation	28
3.3.1. Synthèse de la carbidopa dérivatisée	28
3.3.2. Optimisation du pH nécessaire à la dérivatisation	29
3.3.3. Optimisation du temps de dérivatisation	29
3.4. Extraction liquide / liquide	30
3.4.1. Optimisation du temps de l'extraction liquide/liquide	30
3.4.2. Stabilité d'une solution dérivatisée après extraction l/l	30

3.5.	La validation	32
3.5.1.	La spécificité	32
3.5.2.	La fidélité	34
3.5.3.	L'exactitude	35
3.5.4.	La limite de détection	36
3.5.5.	La limite de quantification	36
3.5.6.	La linéarité	36
4.	DISCUSSION	37
4.1.	Solubilisation et stabilité de la carbidopa	37
4.2.	Extraction sur résine	38
4.2.1.	Extraction de la carbidopa sur résine, en mode batch	38
4.2.2.	Extraction de la carbidopa sur cartouches de résine	39
4.2.3.	Comparaison des deux méthodes d'extraction	40
4.2.4.	Synthèse de la carbidopa dérivatisée	40
4.2.5.	Optimisation du pH lors de la dérivatisation	40
4.2.6.	Optimisation du temps de dérivatisation	41
4.3.	L'extraction liquide/liquide	41
4.3.1.	Optimisation du temps d'extraction	41
4.4.	La validation	41
4.4.1.	La spécificité	41
4.4.2.	La fidélité	42
4.4.3.	L'exactitude	42
4.4.4.	La limite de détection et de quantification	42
4.4.5.	La linéarité	42
5.	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	43
6.	REMERCIEMENTS	43
7.	BIBLIOGRAPHIE	44
8.	ANNEXES	45

Abréviations utilisées

A(PO)	aire de la phase organique correspondant à la benzalazine
CD	carbidopa
DHPA	dihydroxyphénylacétone
EDTA	acide éthylènediaminetétraacétique
HPLC	chromatographie liquide à haute performance
l/l	liquide/liquide
LD	limite de détection
LQ	limite de quantification
MeOH	méthanol
meq	milliéquivalent
ppm	partie par million
RMN	résonance magnétique nucléaire
rpm	round per minute (tour par minute)
rsd	écart type relatif [%]
TA	température ambiante
t _R	temps de rétention
UV	ultraviolet

Les échantillons de carbidopa sont donnés sous la forme YYMM-LLL où YY et MM correspondent, respectivement, à l'année et au mois de fabrication, LLL est l'incrémentation. Si la série de chiffre est suivie d'un « M », la carbidopa est alors micronisée.

1. INTRODUCTION

La carbidopa est un principe actif permettant de lutter contre la maladie de Parkinson. Lors de la synthèse de cette molécule, une impureté, l'hydrazine, est susceptible d'être présente dans la préparation pharmaceutique. L'hydrazine est toxique et sa teneur dans la carbidopa ne doit pas dépasser 20 ppm [1].

Lors de l'analyse de l'hydrazine résiduelle de synthèse, la carbidopa se dégrade et forme de l'hydrazine supplémentaire. Le but de ce travail est alors d'éviter au maximum cette dégradation et de différencier ensuite l'hydrazine résiduelle de synthèse et l'hydrazine formée lors de l'analyse.

1.1. La carbidopa et la maladie de Parkinson

La carbidopa (Figure 1) est associée à la levodopa pour lutter contre la maladie de Parkinson, elle n'a pas d'effet thérapeutique si elle est administrée seule.

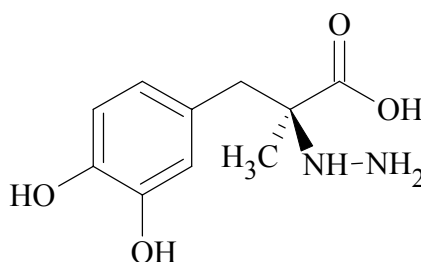


Figure 1 : Carbidopa

La maladie de Parkinson est un dérèglement de la balance des neurotransmetteurs dans le cerveau : l'acétylcholine et la dopamine. Les symptômes principaux observés sont des tremblements, une rigidité des mouvements et une augmentation de la salivation et des larmes. Ces troubles sont dus à un trop faible taux de dopamine dans le cerveau [1].

L'administration de la levodopa permet la transmission de la dopamine aux noyaux gris centraux du cerveau. Comme la levodopa est rapidement décarboxylée par la décarboxylase, une grande partie de la dose administrée est inactivée avant d'avoir atteint son lieu d'action dans le cerveau. Il en résulte l'obligation d'administrer aux patients des doses massives souvent mal supportées. L'association de la levodopa avec un inhibiteur de la décarboxylase, la carbidopa, permet de réduire les doses ainsi que les effets indésirables qui s'ensuivent [1].

1.2. L'hydrazine et sa dérivatisation

Une attention particulière est portée à l'hydrazine, composé résiduel provenant de la synthèse ou de la dégradation de la carbidopa.

L'hydrazine est un liquide incolore, de formule N_2H_4 et un agent réducteur qui se décompose lentement à l'air [3]. Cette substance est surtout utilisée comme agent de désoxygénation pour le traitement anticorrosif dans les chaudières, carburant pour fusée et piles à combustibles [4].

L'hydrazine est un irritant local qui est facilement absorbé à travers la peau et par inhalation, ce qui peut provoquer des bronchites et des oedèmes pulmonaires [5]. De plus, elle est suspectée d'être un composé mutagène et carcinogène [5]. A cause de ces effets toxicologiques, la détermination de l'hydrazine à de faibles concentrations est nécessaire et une méthode sensible et reproductible est donc indispensable. La pharmacopée européenne exige la recherche de l'hydrazine dans la carbidopa et fixe la limite à 20 ppm [1].

L'hydrazine étant invisible aux UV, la plupart des méthodes publiées sur la détermination de l'hydrazine repose sur la formation d'un dérivé pour former un azine, habituellement par réaction avec un aldéhyde aromatique, mais d'autres réactifs de dérivatisation ont aussi été utilisés, tels que l'acide acétique et la 2,4-pentandione [1].

Lors de ce travail, la benzaldéhyde est utilisée comme agent dérivatisant pour former la benzalazine (Figure 2), chromophore dont le maximum d'absorption se situe à 300 nm (Figure 3).

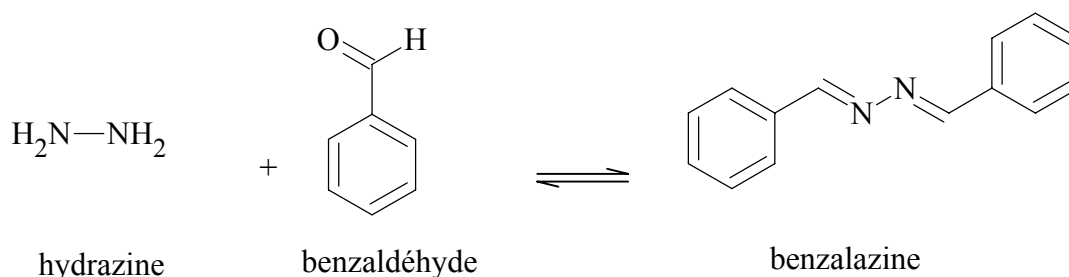


Figure 2 : Dérivatisation de l'hydrazine par le benzaldéhyde

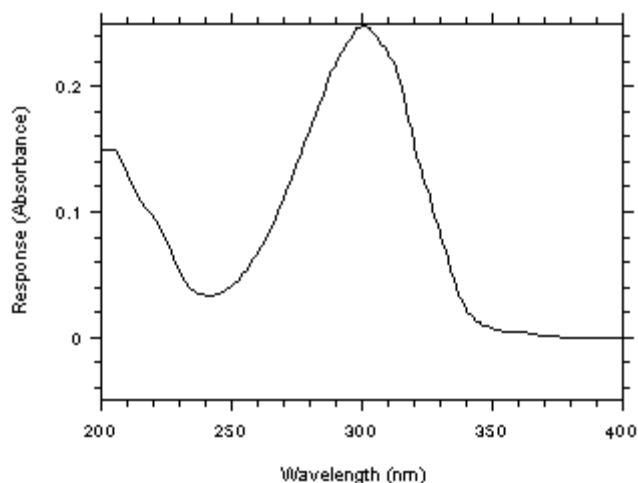


Figure 3 : Spectre UV de la benzalazine [6]

La dérivation nécessite une catalyse acide car l'addition de l'hydrazine sur la fonction carbonyle enduit à un amino-alcool peu stable. La catalyse acide accélère la réaction en activant la fonction carbonyle. Si le pH est trop bas, l'amine est protonée et l'addition nucléophile ne peut pas avoir lieu.

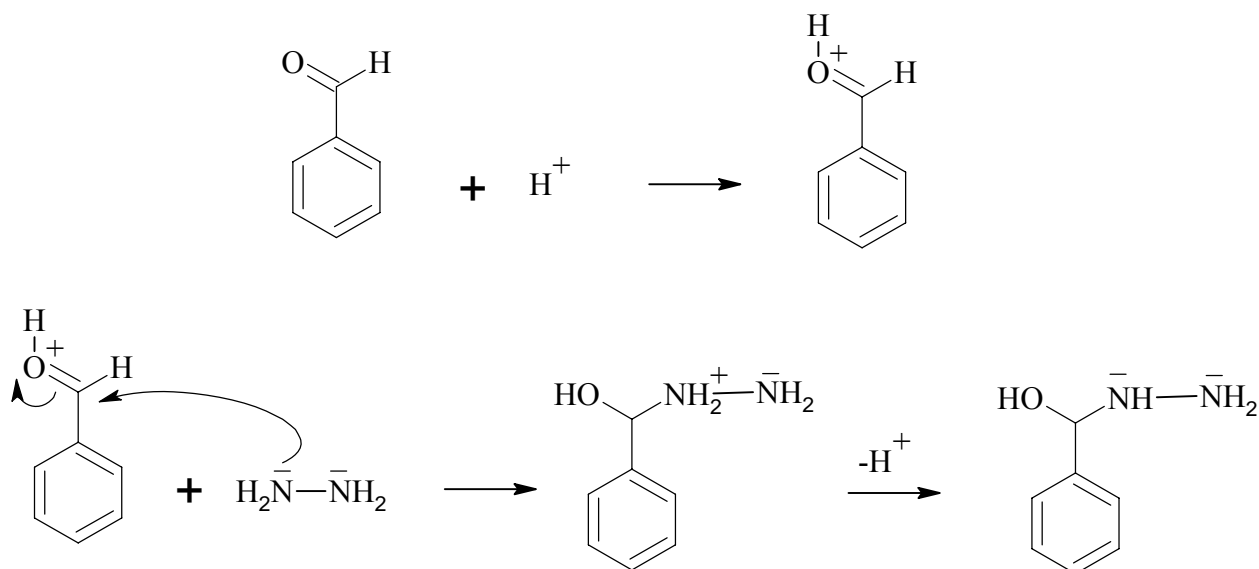


Figure 4 : Mécanisme de l'addition nucléophile de l'hydrazine sur la carbidopa

De plus, en milieu acide, les amino-alcools se déshydratent facilement pour former la double liaison désirée.

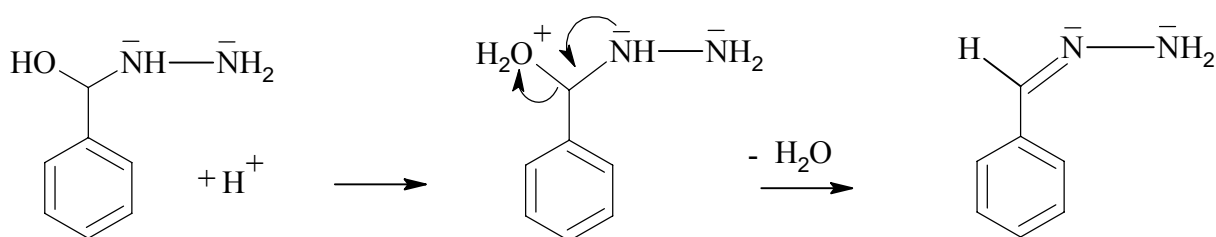


Figure 5 : Déshydratation de l'amino-alcool

Le deuxième groupe NH_2 réagit de la même manière avec une deuxième benzaldéhyde.

1.3. Quantification de l'hydrazine

Une méthode de quantification de l'hydrazine dans la carbidopa par chromatographie sur couche mince est déjà décrite dans la monographie de la carbidopa [8]. Il est cependant très difficile de quantifier l'hydrazine par cette méthode. En effet, la différence d'intensité des spots est trop faible pour permettre de déterminer des différences de concentrations en hydrazine de l'ordre de quelques ppm. De plus, cette méthode est très longue, la préparation et l'élution de six échantillons nécessitent une journée [9].

Des publications antérieures décrivent le dosage de l'hydrazine, dans des substances pharmaceutiques autre que la carbidopa, par chromatographie échangeuse d'ions avec détecteur électrochimique [10], par spectrophotométrie sur phase solide avec détecteur UV [5], par plaque de silicagel fluorescente avec détection UV [1], par chromatographie gazeuse avec un détecteur azote phosphore [11] ou capture d'électrons [12]. Toutes ces méthodes, hormis la chromatographie échangeuse de cation nécessitent la dérivation de l'hydrazine avant l'analyse.

La Pharmeuropa cite une méthode permettant de quantifier l'hydrazine dans la carbidopa par chromatographie liquide à haute performance avec une détection UV et ainsi que par chromatographie échangeuse de cations avec détection ampérométrique [1]. Cette dernière n'a pas été retenue pour remplacer la méthode CCM de la monographie de la carbidopa. Lors de ce travail, un intérêt particulier a été porté sur la méthode HPLC-UV.

1.4. La carbidopa et sa dégradation

La carbidopa est une poudre blanche peu soluble dans l'eau, très peu soluble dans l'alcool, pratiquement insoluble dans le chlorure de méthylène [8]. Elle se dissout dans les solutions diluées d'acides minéraux [8] et en milieu basique.

La stabilité de la carbidopa augmente avec un accroissement de l'acidité et une diminution de la température de stockage [13] mais elle n'est tout de même pas stable en solution. Les produits principaux de dégradation de la carbidopa sont la dihydroxyphénylacétone (DHPA) et l'hydrazine [13].

1.5. Résine échangeuse d'ions

Pour éviter la dégradation de la carbidopa, il est nécessaire de l'extraire avant la dérivation. A cet effet, une résine échangeuse d'anions est utilisée.

Une résine échangeuse d'ions est un solide insoluble dont l'apparence est celle de petites billes. Elle est constituée d'un support, les plus communs sont le styrène-divinylbenzène et l'acrylique divinylbenzène [14], auquel sont greffés des groupements fonctionnels. Un contre ion, de charge opposée au groupement fonctionnel, est adsorbé au polymère et s'échange, généralement de manière réversible, avec les ions de même signe présents dans la solution. Les ions et le solvant forment un équilibre entre la résine échangeuse d'ions et le liquide externe à la résine [14].

La sélectivité est définie par l'affinité entre la résine et les différents ions. Elle dépend de la nature de la résine, du groupement fonctionnel et de l'ion entrant en réaction.

La Figure 6 illustre une résine échangeuse d'anions. Le même principe s'applique à la résine échangeuse de cations où les groupes fonctionnels seraient des acides carboxyliques ou des

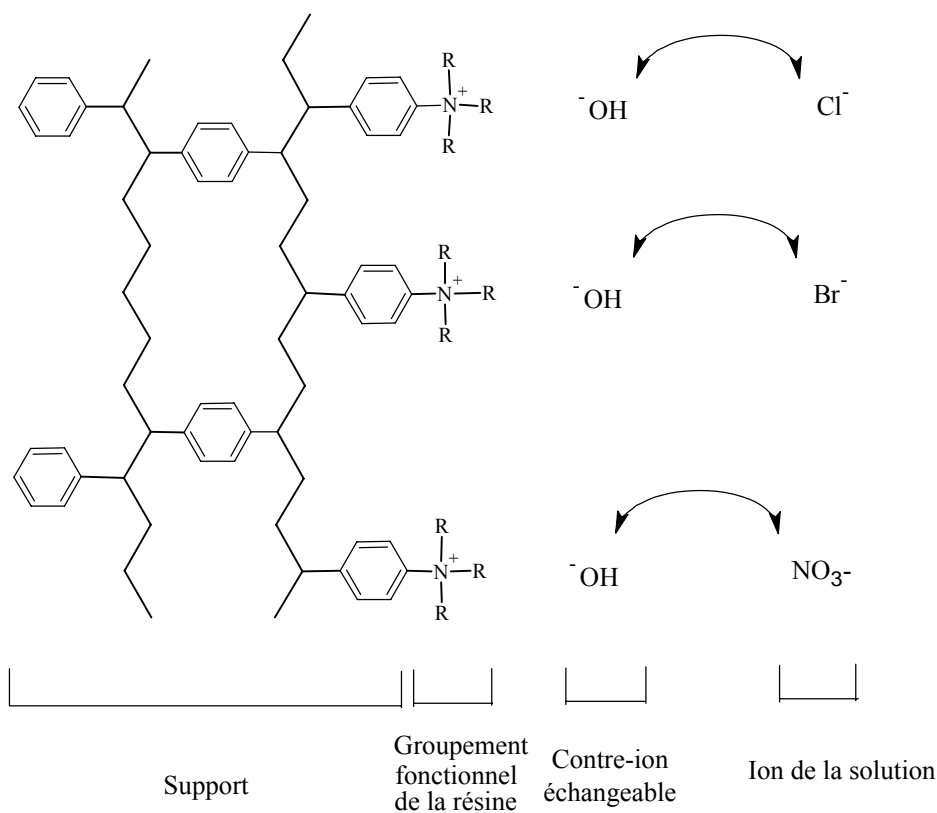


Figure 6 : Principe de l'échangeur d'anions

La capacité totale d'échange d'une résine, exprimée en milliéquivalents par unité de masse ou de volume de résine, représente le nombre de sites actifs disponibles [16]. La capacité totale est proportionnelle à la charge du soluté. Par exemple, si le soluté est doublement chargé, la capacité totale est divisée par deux.

Les résines échangeuses d'anions sont réparties en plusieurs classes selon leur basicité. Dans la Figure 7, les échangeurs d'anions représentés dans les réactions sont classés par ordre de basicité décroissante [16].

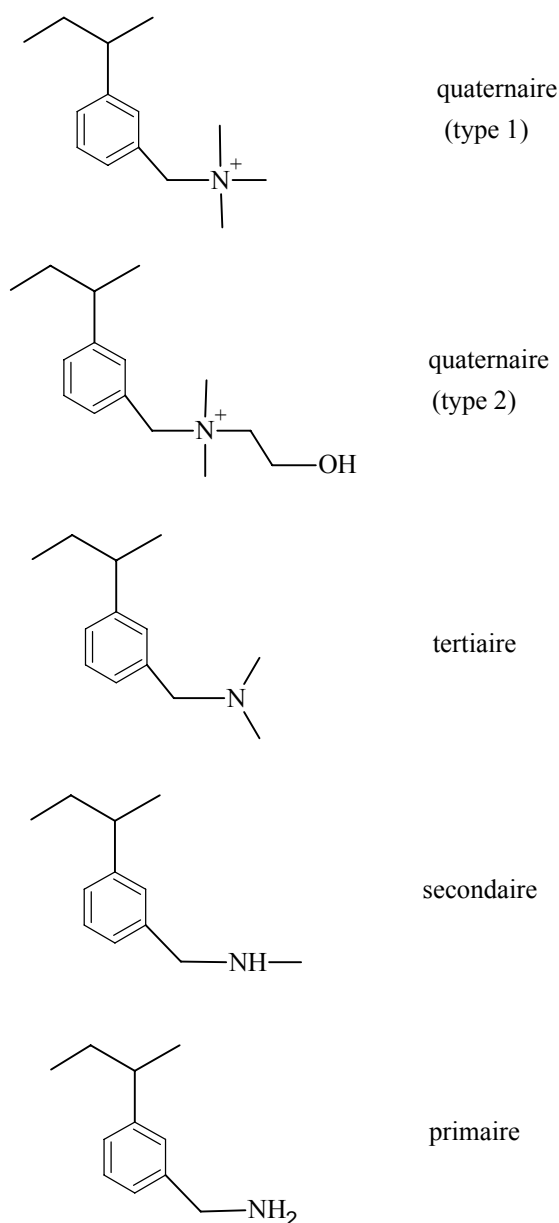


Figure 7 : Echangeurs d'anions polystyréniques

Les résines ayant des groupes ammonium quaternaire sont toutes fortement basiques. Par convention, elles sont appelées :

- type 1, les groupes benzyltriméthylammonium, les plus fortement basiques
- type 2, les benzyldiméthyléthanolammonium, dont la basicité est légèrement plus faible [16].

Lors de ce travail, une résine échangeuse d'anions très fortement basique de type 1 est utilisée avec une matrice styrène-divinylbenzène.

La résine peut se présenter sous forme de résine en vrac, qui permet de travailler en mode batch, ou sous forme de cartouche de résine.

La figure ci-dessous représente une coupe de la cartouche. Ces cartouches s'utilisent avec une seringue qui est introduite dans le raccord femelle et le filtrat, exempt du produit retenu est récupéré à la sortie (raccord mâle).

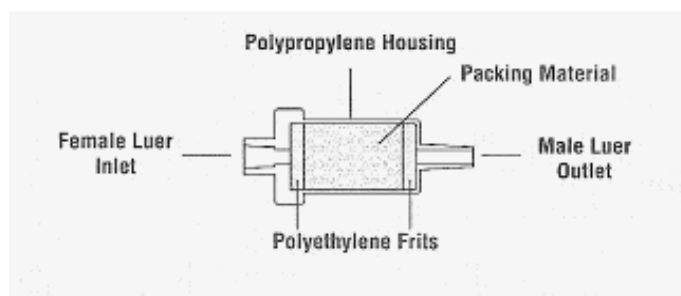


Figure 8 : Schéma d'une cartouche Alltech Maxi-Clean [17]

1.6. La validation

La méthode permettant la quantification de l'hydrazine dans la carbidopa, une fois développée et optimisée, est validée selon les normes ICH (International Conference on Harmonisation).

La validation consiste en une suite d'études expérimentales qui permettent de prouver que la méthode est en accord avec son domaine d'application. Le domaine d'application correspond à l'ensemble des spécifications, posées dès le départ, qui précisent les types de matrice, les gammes de concentrations en analyte, les niveaux d'incertitude acceptables (justesse, fidélité), parfois certaines conditions d'emploi [18].

D'après les normes ICH, lors la validation d'une méthode analytique pour le dosage d'une impureté, les points suivants doivent être étudiés.

1.6.1. La spécificité

La détermination de la spécificité d'une procédure analytique est tirée de la comparaison des résultats de la procédure appliquée au produit à analyser, au blanc et à d'éventuelles substances apparentées (t_R , résolution, ...). Une méthode est spécifique lorsqu'elle permet de mesurer l'analyte avec la garantie que le signal instrumental ne provient que de l'analyte [18].

1.6.2. La fidélité

La fidélité est étudiée sous deux aspects, la répétabilité et la répétabilité intermédiaire.

La répétabilité définit la fidélité sous des conditions identiques. Les mesures sont effectuées par un même opérateur, sur un même instrument, avec une méthode unique et dans un délai court. L'objectif est d'obtenir des mesures dans des conditions les plus similaires possibles [18].

La répétabilité intermédiaire ou fidélité intermédiaire définit la fidélité sous des conditions différentes. L'opérateur, les instruments, le jour de l'analyse sont variés. Elle s'exprime généralement, si l'homogénéité des variances est prouvée, par l'écart type relatif de fidélité intermédiaire et par l'intervalle de confiance de la moyenne des résultats obtenus.

La répétabilité intermédiaire est vérifiée par le test de Cochran. L'objectif de ce test est de vérifier simultanément si une série de variances sont comparables [19] et permet d'affirmer si les variances des séries de mesures sont homogènes.

1.6.3. L'exactitude

La justesse est l'écart entre la mesure, ou la moyenne des mesures, et la valeur conventionnellement vraie de l'échantillon. La valeur conventionnellement vraie de l'échantillon est fournie par consensus à partir des valeurs de mesures répétées [18]. La valeur vraie est déterminée de préférence à l'aide des CRM (Certified Reference Materials) ou, à défaut, des RM (Reference Materials), ou, en dernier ressort, la technique des ajouts dosés.

1.6.4. La limite de détection

La limite de détection d'une procédure analytique est la quantité minimale d'analyte dans un échantillon qui peut être détectée mais pas nécessairement quantifiée [20].

1.6.5. La limite de quantification

La limite de quantification d'une procédure analytique est la quantité minimale d'analyte dans l'échantillon qui peut être déterminée quantitativement avec une précision et une exactitude suffisante [20].

1.6.6. La linéarité

La linéarité est la capacité à obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration en analyte.

1.6.7. L'intervalle

L'intervalle d'une procédure analytique est l'intervalle entre la quantité minimale et maximale de l'analyte dans l'échantillon pour lequel il a été démontré que la procédure analytique a une précision, une exactitude et une linéarité suffisante [20].

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Réactifs

Les réactifs utilisés lors de cette expérience sont listés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 1 : Réactif utilisés

Nom	Formule	Provenance et n° d'article	Toxicités
Acide chlorhydrique fumant 37 %	HCl	Merck 1.00317.1000	Corrosif
N,N'-DiBenzalhydrazine	C ₁₄ H ₁₂ N ₂	Trans World Chemicals incorporated D1570	Irritant
Benzaldéhyde ≥ 99.0 %	C ₇ H ₆ O	Fluka 23605002	Nocif
Carbidopa	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₅	Sochinaz, lot n°511-089M	-
Carbidopa	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₅	Sochinaz, lot n°701-104	-
Carbidopa	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₅	Sochinaz lot n°701-104M	-
Carbidopa	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₅	Sochinaz lot n° 706-115	-
Carbidopa	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₅	Sochinaz lot n°710-116	-
Dihydrogénophosphate de potassium p.a.	KH ₂ PO ₄	Merck 1.04873.1000	-
Disulfite de sodium p. a.	Na ₂ S ₂ O ₅	Merck 1.06525.0100	Comburent
EDTA	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	Titrisol 1.09992	Irritant
Heptane	C ₇ H ₁₆	Merck 1.04379.2500	Facilement inflammable, nocif, dangereux pour l'environnement
Hydrogénophosphate de di-sodium dodécahydraté p.a	Na ₂ HPO ₄ ×2H ₂ O	Merck 1.06579.0500	-
Méthanol	CH ₃ OH	J.T. Backer 8402	Inflammable et toxique
Méthanol-d ₄ 99.8 + atom %	CD ₃ OD	Aldrich 151947	Inflammable, toxique
Sulfate d'hydrazine p.a. GC	N ₂ H ₄ . H ₂ SO ₄	Merck 1.04603.0100	Toxique et dangereux pour l'environnement

2.2. Matériel et appareillage

Le matériel utilisé lors de cette expérience est cité ci-dessous.

- Matériel usuel de laboratoire de type analytique et organique
- Balance analytique Mettler Toledo AX205 DeltaRange®
- Balance de laboratoire Mettler PM 460 DeltaRange®
- pH-mètre Metrohm 713
- Dowex SBR LC NG OH, Procher AG
- Waters, cartouches Oasis MAX Plus 225 mg, 186003517
- Dionex, cartouches OnGuard II A 1 cc, 57091
- Alltech, cartouches Maxi-Clean IC-OH 1.5 ml 30254
- Macherey-Nagel, Chromafix PS-OH (M), 731 860
- RMN ARX400
- Bain ultrasons Branson 5510
- Trompe à eau Burkert, Buechi 024 IDC 0.2-6 bar, CH02082
- Bain d'eau Büchi 461
- Rotavapor Büchi RE111
- Vortex Genie 2, Scientific Industries
- HPLC-UV, Agilent Technologies 1100
- HPLC-UV, Agilent Technologies 1200
- Centrifugeuse Gettich EBA 8S

2.3. Méthodes

2.3.1. Préparation de la solution de carbidopa

Environ exactement 165 ± 5 mg de carbidopa sont pesés dans un ballon jaugé de 5 ml. 0.8 ml d'acide chlorhydrique 2 N est ajouté et le tout est vortexé 2 minutes puis passé 10 secondes aux ultrasons. Si toute la carbidopa n'est pas dissoute, vortexer jusqu'à solubilisation totale. La solution est ajustée au trait de jauge avec de l'eau et le tout est agité vigoureusement.

La solution de carbidopa doit être utilisée directement après sa préparation.

2.3.2. Préparation des solutions standards

Dans un ballon jaugé de 10.0 ml, environ exactement 20 mg de sulfate d'hydrazine sont pesés et solubilisé avec HCl 2 N. Le volume est ajusté au trait de jauge avec le même acide. Cette solution est diluée cent fois. Les solutions standard sont préparées à partir de la solution diluée. Celle-ci est diluée 2, 2.5, 3.3, 5, 10 et 20 fois pour obtenir des concentrations en hydrazine d'environ 2500, 2000, 1500, 1000, 500, 250 ng/ml. La solution de 250 ng/ml est diluée 50 fois pour donner une solution de concentration en hydrazine d'environ 5 ng/ml.

2.3.3. Extraction sur résine en batch

Dans un erlenmeyer de 250 ml, 30 g \pm 5 g de résine Dowex échangeuse d'anions sont régénérés dans 150 ml d'eau pendant 30 minutes à température ambiante et le tout est agité de temps en temps. La suspension est ensuite décantée et l'opération est répétée une seconde fois.

Dans un tube à centrifuger de 10 ml, 3 g \pm 0.1 g de résine régénérée sont pesés et 2 ml d'eau millipore y sont ajoutés. Au fond de chaque tube, un courant rapide d'azote est introduit à l'aide d'un tuyau muni d'une pipette Pasteur, pendant 15 minutes (Figure 9).

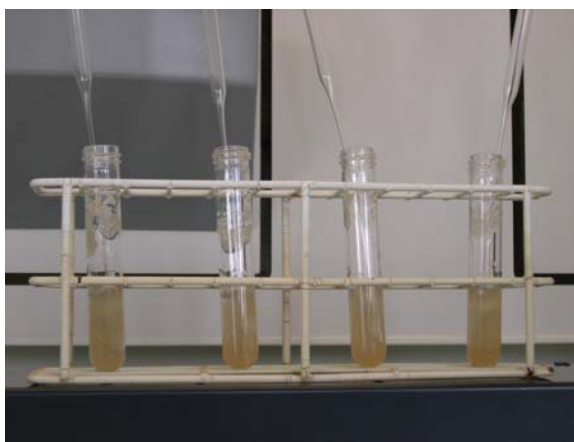


Figure 9 : Barbotage de l'azote dans la résine

Sans interruption de l'arrivée du gaz, 1.0 ml de solution standard ou de solution de carbidopa est introduit au cœur de la résine à l'aide d'une micropipette. Après 2 minutes, la pipette Pasteur est retirée du tube, le surnageant est relevé à l'aide d'une pipette Pasteur et déposé dans un autre tube à centrifuger de 10 ml contenant 1 ml de solution tampon pH 5.5. Dans le tube contenant la résine, 2 ml d'eau millipore sont ajoutés, le flux d'azote est réintroduit dans la résine pendant 3 à 4 secondes. Le surnageant est ensuite récupéré et déposé avec la première fraction. Le lavage avec 2 ml d'eau est répété une seconde fois.

Aux trois fractions réunies, 1 ml de solution de benzaldéhyde 30 g/L méthanol sont ajoutés. Le tout est agité manuellement pendant 2 minutes. 2.0 ml d'heptane sont additionnés à la solution et celle-ci est agitée pendant 2 minutes. Une émulsion se forme et la décantation est accélérée par centrifugation pendant 3 minutes à 3500 rpm.

La phase organique, soit la phase supérieure, est prélevée et injectée par HPLC et la benzalazine est quantifiée par UV (point 2.3.10.).

2.3.4. Extraction sur résine Alltech IC-OH

La résine est lavée de ses contaminants interstitiels avec 10 ml d'eau millipore à un débit d'environ 1 ml/min. La résine est ensuite conservée au moins 30 minutes dans l'eau (Figure 10). Elle ne doit jamais sécher.



Figure 10 : Cartouche Alltech IC-OH en cours d'utilisation

2.0 ml de solution à analyser sont introduits dans la seringue à l'aide d'une micropipette. La totalité de la solution est introduite dans la résine à un débit de 0.6 ml/min. La toute première fraction (environ 0.3 ml) n'est pas récoltée. Le filtrat est ensuite récupéré dans un tube contenant 1 ml de solution tampon phosphate pH 5.5. La résine est ensuite lavée avec 1 ml d'eau millipore rassemblé avec la première fraction récoltée. Les 2.7 ml de solution récoltés sont ensuite dérivatisés avec 1 ml de benzaldéhyde 30 g/l méthanol pendant 2 minutes, sous agitation au vortex. 2.0 ml d'heptane sont ensuite ajoutés et le tout est agité 2 minutes supplémentaires au vortex. L'émulsion formée est centrifugée pendant 3 minutes à 3500 rpm.

La phase organique est prélevée et la benzalazine est quantifiée par HPLC-UV (point 2.3.10.)

2.3.5. Optimisation du débit sur la cartouche Alltech IC-OH

2.0 ml d'une solution de carbidopa (lot 511-089M) de 9.9 mg/ml HCl 0.13 N est déposé sur la résine et élué à un débit donné. La résine est ensuite lavée avec 6 ml d'eau. Chaque fraction de 1 ml est récoltée et dérivatisée avec 1 ml de solution de benzaldéhyde 30 g/l pendant 2 minutes, sous agitation. 2.0 ml d'heptane sont ensuite ajoutés et le tout est agité pendant 2 minutes avant d'être centrifugé 4 minutes à 3500 rpm.

2.3.6. Optimisation du pH nécessaire à la dérivatisation

Une solution standard d'une concentration d'hydrazine de 517 ng/ml HCl 2 N est préparée.

La méthode du point 2.3.1 est appliquée. Le tampon phosphate de pH 5.5 est remplacé par des tampons phosphate de pH 3.5, 2.0 et une solution de HCl 0.8 N.

Chaque essai est répété trois fois.

2.3.7. Optimisation du temps de dérivation

Une solution standard d'une concentration d'hydrazine de 517 ng/ml HCl 2 N est préparée.

La méthode du point 2.3.1 est appliquée mais la durée de la dérivation est variée. Les temps de dérivation sont fixés à 1, 1.5, 2 et 2.5 minutes.

Chaque essai est répété trois fois.

2.3.8. Optimisation du temps d'extraction

Une solution standard d'une concentration d'hydrazine de 517 ng/ml HCl 2 N est préparée

La méthode du point 2.3.1 est appliquée mais la durée de la l'extraction liquide/liquide est variée. Les temps d'extraction sont fixés à 1, 1.5, 2 et 2.5 minutes.

Chaque essai est répété trois fois.

2.3.9. Méthode HPLC pour analyse de la carbidopa

La carbidopa est séparée de l'hydrazine par extraction sur une résine échangeuse d'anions. La carbidopa est censée être retenue par cette résine. Pour vérifier la présence de carbidopa dans le filtrat, une méthode HPLC-UV est utilisée et les paramètres sont les suivants :

- Colonne : Lichrocart Pursospher STAR RP-18 2 μ m, 55 \times 4 mm
- Phase mobile : 0.1 mol KH_2PO_4 / 1 H_2O / MeOH (49,1)
- Débit : 1 ml/min
- Injection 20 μ l
- Détection : 282 nm
- Temps d'analyse : 4 minutes
- Température : température ambiante
- Pression : 100 bars

2.3.10. Méthode HPLC pour l'analyse de l'hydrazine

L'hydrazine dérivatisée, soit la benzalazine, est quantifiée par HPLC-UV avec les paramètres suivants :

- Colonne : Altima C18 5 μ m, 250 \times 4.6 mm
- Phase mobile : EDTA 0.1 N, H_2O MQ, CH_3CN 6/594/1400 (V:V:V)
- Débit : 1 ml/min
- Injection 20 μ l
- Détection : 300 nm
- Temps d'analyse : 20 minutes
- Température du four : température ambiante
- Pression : 82 bars

2.3.11. Synthèse de la carbidopa dérivatisée

Dans un ballon de 100 ml, environ 1.6 g de carbidopa sont pesés et solubilisés dans un minimum d'HCl 4 N. Après solubilisation, 0.80 g de benzaldéhyde est ajouté et deux phases se forment. Quelques gouttes de méthanol sont additionnées jusqu'à l'obtention d'une phase homogène.

La solution est agitée pendant 30 minutes à température ambiante. Le solvant est évaporé à sec à l'évaporateur rotatif (50°C, 10 mbar).

Pour sécher le produit dans le but d'effectuer une analyse RMN ^1H , le solide obtenu est repris dans du méthanol deutéré et le solvant est à nouveau évaporé. Le produit obtenu est jaune, de consistance collante.

2.3.12. Analyse RMN

Les échantillons sont solubilisés dans du méthanol deutéré et les protons sont analysés à l'aide d'un appareil RMN ARX 400 avec les paramètres suivants :

- Fréquence : 400 MHz
- Méthode : zg
- Détecteur : 5 mm QNP 1H
- Référence : méthanol deutéré : 3.31 et 4.78 ppm [21]

2.3.13. La validation

2.3.13.1. Spécificité

La spécificité a été effectuée sur l'heptane et une solution de benzaldéhyde 30g/L MeOH qui ont tous deux été injectés tels quels. Un blanc, une solution standard de 2076 ng/ml ainsi qu'un échantillon de carbidopa (lot 701-104M) ont subi le processus de préparation des échantillons (point 2.3.4).

2.3.13.2. La fidélité

La répétabilité est effectuée sur une solution standard correspondant à une concentration de sulfate d'hydrazine de 1038 ng/ml et sur un échantillon de carbidopa (lot 701-106) selon la procédure décrite au point 2.3.4.

Le processus de préparation des échantillons est répété cinq fois sur une même solution standard. Par contre, la dégradation de la carbidopa exige une solution fraîche. La solution de carbidopa est donc fraîchement préparée avant chaque extraction sur résine et le processus est aussi répété cinq fois.

La répétabilité intermédiaire est effectuée sur l'échantillon de carbidopa (lot 706-115). Avant chaque extraction sur résine, la solution de carbidopa est fraîchement préparée. L'opérateur, l'HPLC et le jour ont été variés. Trois séries de cinq échantillons ont été effectuées.

Test de Cochran

La répétabilité intermédiaire est vérifiée à l'aide du test de Cochran qui se déroule comme suit [22]:

1. Calculer la variance s_i^2 de chaque série ainsi que la somme $S = \sum s_i^2$
2. Déterminer quelle est la variance la plus élevée s_{\max}^2
3. Calculer le rapport $T_f = \frac{s_{\max}^2}{S}$
4. Relever les valeurs limites dans les tables pour un certain nombre de série (p) et un nombre d'échantillons (n) par série, aux risques de 5 % et 1 %.
5. Règle de décision :
 - si T_f est supérieur à la valeur de la table au risque d'erreur 1 %, le laboratoire est considéré comme aberrant ;
 - si T_f est supérieur à la valeur de la table au risque d'erreur de 5 %, le laboratoire est considéré comme suspect.

2.3.13.3. L'exactitude

Les références certifiées n'étant pas disponibles, l'exactitude a été vérifiée par la méthode des ajouts dosés.

Une solution de carbidopa est préparée comme décrit au point 2.3.1 en y introduisant, avant l'ajustement au trait de jauge, 500 µl d'une solution standard. Le dopage est effectué sur trois échantillons de carbidopa fraîchement préparés, avec une solution de 1700 ng/ml, 3401 ng/ml et 6802 ng/ml. La préparation se déroule ensuite comme décrit au point 2.3.4.

L'exactitude est exprimée par le taux de recouvrement qui correspond à

$$A = \frac{X_a}{X_m} \times 100 \quad (\text{éq. 1})$$

avec : X_a : quantité d'hydrazine à doser (calculé par la pesée des ajouts dosés)

X_m : quantité d'hydrazine trouvée par HPLC (calculé par rapport à la droite de calibration)

L'exactitude peut aussi être exprimée par :

$$X_d = \frac{|X_a - X_m|}{X_a} \times 100 \quad (\text{éq. 2})$$

La moyenne (\bar{A}) ainsi que l'écart type des recouvrements (s_A) sont ensuite calculés. Le facteur de student $t_{(\alpha, n-1)}$ est alors déterminé par la table de student, avec α = niveau de signification et n = nombre d'échantillons [23].

L'intervalle de confiance du taux de recouvrement s'exprime $\bar{A} \pm \frac{s_A}{\sqrt{n}} \times t_{(\alpha, n-1)}$.

2.3.13.4. La limite de détection

Le seuil de détection est calculé selon la formule

$$LD = 3 \times h_I \times \frac{C_H}{H_I} \quad (\text{éq. 3})$$

avec LD : limite de détection [mg/ml]

h_I : hauteur du bruit de fond [mAU]

H_I : hauteur d'un pic correspondant à une faible concentration d'analyte [mAU]

C_I : concentration d'analyte [mAU]

2.3.13.5. La limite de quantification

La limite de quantification correspond à trois fois la limite de détection [20]:

$$LQ \approx 3 \times LD \quad (\text{éq. 4})$$

Une solution standard sur laquelle la procédure analytique (point 2.3.4) a été appliquée est injectée sept fois.

2.3.13.6. La linéarité

Les solutions standard sont préparées comme décrit au point 2.3.2.

Toutes ces solutions sont préparées selon le protocole décrit au point 2.3.4 et une droite de calibration est établie.

3. RESULTATS

La quantification de l'hydrazine nécessite une dérivation par un aldéhyde tel que le benzaldéhyde. Cette dérivation provoque une dégradation de la carbidopa en hydrazine et engendre ainsi un surdosage de l'hydrazine dans la carbidopa [1].

L'extraction de la carbidopa a été effectuée sur plusieurs résines. Les conditions de dérivation de l'hydrazine ont été optimisées ainsi que les conditions d'extraction liquide/liquide nécessaire à l'isolation de la benzalazine (Figure 2).

3.1. Stabilité de la carbidopa en solution

La stabilité de la carbidopa en solution a été observée par quantification de l'hydrazine dans la carbidopa en fonction du temps.

L'hydrazine a été quantifiée, comme décrit au point 0, dans le lot de carbidopa 511-089M fraîchement solubilisé et le résultat obtenu était de 54 ppm. Une heure après la mise en solution de la carbidopa, l'hydrazine a été quantifiée une nouvelle fois et sa teneur atteignait 69 ppm, ce qui correspond à une augmentation du taux d'hydrazine de 28 %.

3.2. Extraction sur résine

La séparation de l'hydrazine et de la carbidopa est effectuée sur une résine échangeuse d'anions en vrac ou sous forme de cartouches. Pour chacune, différents paramètres ont été variés et les résultats obtenus sont décrits ci-dessous.

3.2.1. Extraction de la carbidopa sur résine, en mode batch

La résine en vrac Dowex très fortement basique a été testée. La méthode décrite au point 0 est appliquée, seuls les paramètres variés sont décrits.

3.2.1.1. Conditions de réaction

Le tableau suivant exprime le pourcentage de carbidopa retenue lors de la variation de la quantité de résine utilisée, du temps d'extraction et de la quantité de carbidopa déposée. La calibration de la carbidopa se trouve en annexe 1. L'hydrazine provenant de la dégradation de la carbidopa est calculée en supposant que toute la carbidopa se dégrade en hydrazine.

Tableau 2 : Pourcentage de carbidopa extraite et hydrazine potentielle dans différentes conditions d'extraction

Résine [g]	Temps d'extraction [min]	Carbidopa déposée [mg]	Carbidopa extraite [%]	Hydrazine potentielle [ppm]
1	3	53	94.7923	7370
1.5	1	53	98.9121	1540
	2	53	99.9833	24
	3	2.3	99.9941	8
		53	99.9946	8
2	2	53	99.9941	8
			99.9047	135
	3	53	99.9873	18
			99.9789	30
			99.9955	6
			99.9997	0.4
2.5	3	2.3	99.9927	10
3	1	26	99.9983	2
	3	2.3	99.9876	18
		26	99.9995	0.7
			99.9978	3
		53	100.0000	0
			99.9998	0.3
4	3	26	99.9991	1.2
	7	26	100.0000	0
4.5	3	2.3	99.9984	2
5	3	26	99.9943	8
			100.0000	0
			99.9989	2

Le détail des calculs se trouve en annexe 2.

La nécessité du flux d'azote cité dans la monographie [8] lors du dosage de l'hydrazine dans la carbidopa a été vérifiée.

Le Tableau 3 exprime l'aire correspondant à la benzalazine dans la phase organique lorsque la solution de sulfate d'hydrazine est soumise à un flux d'azote ou un flux d'air, avant l'extraction sur résine.

Tableau 3 : *Effet de l'azote et de l'oxygène sur l'hydrazine*

Gaz	A (PO) [mAUxs]	rsd [%]
Aucun	304	4
Azote	289	7
Air	299	5

Le Tableau 4 décrit les aires obtenues correspondant à la benzalazine dans la phase organique lorsque l'échantillon est déposé au cœur de la résine et un courant d'azote ou d'air est introduit dans la résine.

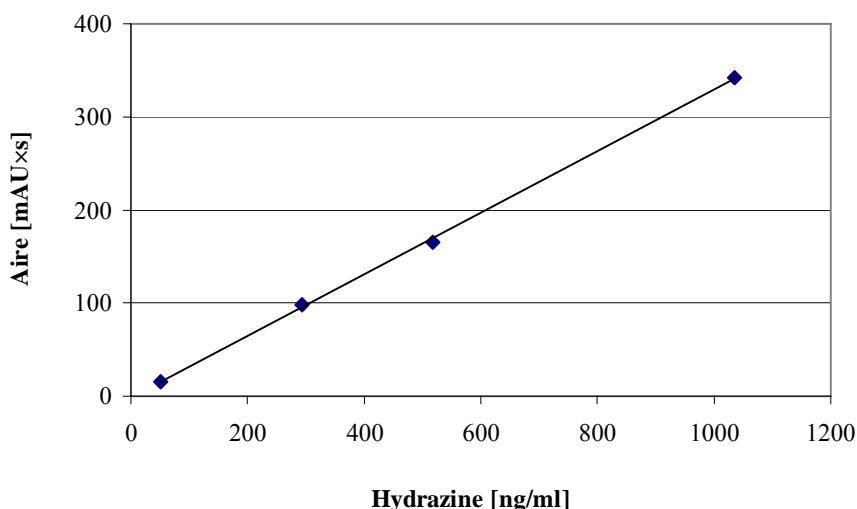
Tableau 4 : *Effet de l'azote et de l'air lors de l'extraction de la carbidopa sur résine*

Echantillon	Gaz	A (PO) [mAUxs]	rsd [%]
Carbidopa	Azote	1125	3
	Air	105	28
Sulfate d'hydrazine	Azote	189	4
	Air	563	150

Les détails des résultats se trouvent en annexe 3.

3.2.1.2. Linéarité

Une droite de calibration a été établie à partir de quatre solutions standard de sulfate d'hydrazine. Elle est représentée dans le Graphique 1.



Graphique 1 : Droite de calibration à partir de standards passés sur résine Dowex

La droite est représentée par l'équation $\text{Aire} = 0.3323 \text{ conc. hydrazine} - 3.2788$ et présente un coefficient de détermination de $R^2 = 0.9996$.

Les points utilisés pour la création du graphique se trouvent en annexe 4.

3.2.1.3. Répétabilité

La répétabilité a été effectuée sur un standard et sur une solution de carbidopa. La solution standard de concentration en hydrazine de 1173 ng/ml présentait une aire moyenne de 478 mAUxs avec un écart type relatif de respectivement 4 %. La solution de carbidopa (lot 511-089M, depuis quelques heures en solution), quant à elle, contenait une concentration en hydrazine de 68 ppm avec un écart type relatif de 2 %.

Les résultats détaillés se trouvent en annexe 5.

3.2.1.4. Dosage de l'hydrazine dans différents lots de carbidopa

L'hydrazine a été quantifiée dans le lot de carbidopa n° 511-089M et les résultats obtenus sont de 50 et 54 ppm. Le lot de carbidopa n°706-115, quant à lui, présentait une teneur en hydrazine de 6.8 ppm.

3.2.2. Extraction de la carbidopa sur cartouches de résine

La résine échangeuse d'anions existe sous forme de cartouches. La méthode appliquée pour les essais ci-dessous est décrite au point 2.3.4., seuls les paramètres changés sont cités.

3.2.2.1. Choix de la cartouche

Diverses résines échangeuses d'anions et une résine apolaire, sous forme de cartouches, ont été testées. La carbidopa non retenue est quantifiée à la sortie de la cartouche par HPLC-UV (point 0).

Tableau 5: Carbidopa retenue après passage sur diverses cartouches de résine

Type de cartouche	Capacité [meq/cartouche]	Carbidopa déposée [mg]	pH [-]	% retenu ^{a)}
Waters Oasis MAX Plus, 225 mg	0.045	0.97	-0.3	0
		4.94	1	0
		3.59	5.5	19
Dionex OnGuard II A, 2.5 cc	0.7	49.6	1.3	81
		3.52	- 0.3	0
MN Chromafix PS- OH, 380 mg	0.23	7.4	2.06	0
Alltech Max-Clean IC-OH 1.5 ml	1.5	120.8	- 0.3	100

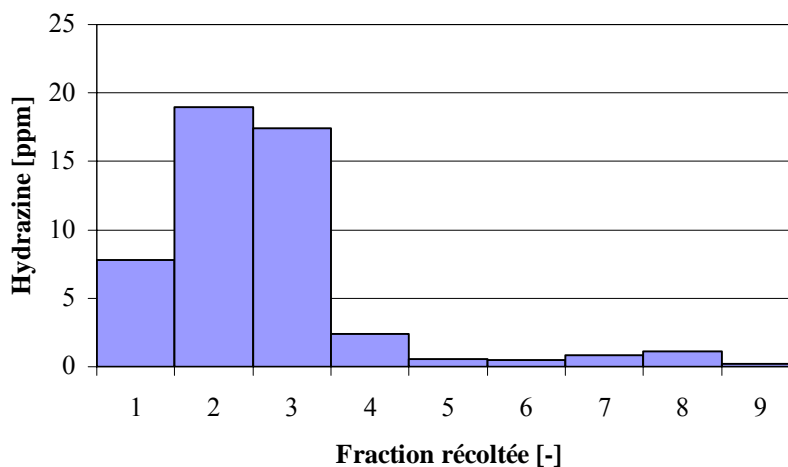
a) % retenu : pourcentage de carbidopa retenue par rapport à la quantité de carbidopa déposée

3.2.2.2. Optimisation du débit

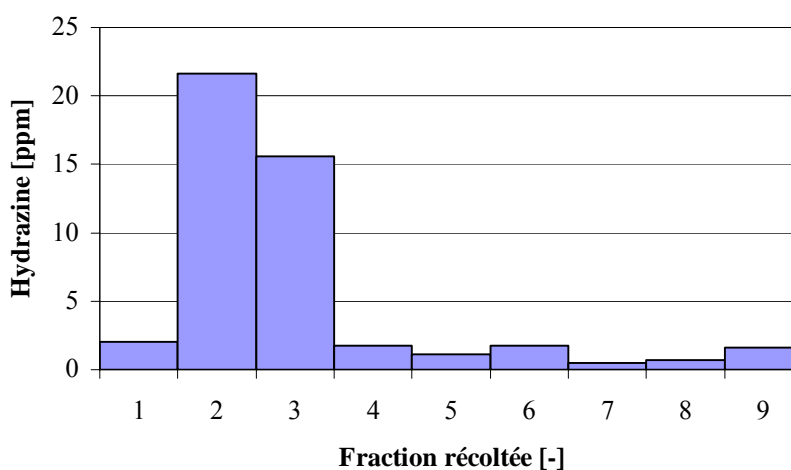
Compte tenu des résultats ci-dessus, la cartouche utilisée pour l'optimisation du débit est la cartouche Alltech IC-OH 1.5 ml.

Le débit recommandé par le fournisseur pour l'obtention d'une rétention maximale des anions est inférieur ou égal à 1 ml/min et la capacité de la résine est de 1.5 méq [17].

Les graphiques suivants expriment la quantité d'hydrazine contenue dans chaque fraction de 1 ml récoltée à un débit de 1 ml/min et 0.6 ml/min.



Graphique 2: Solution de carbidopa de 10 mg/ml (lot n°511-089M) à un débit de 1 ml/min

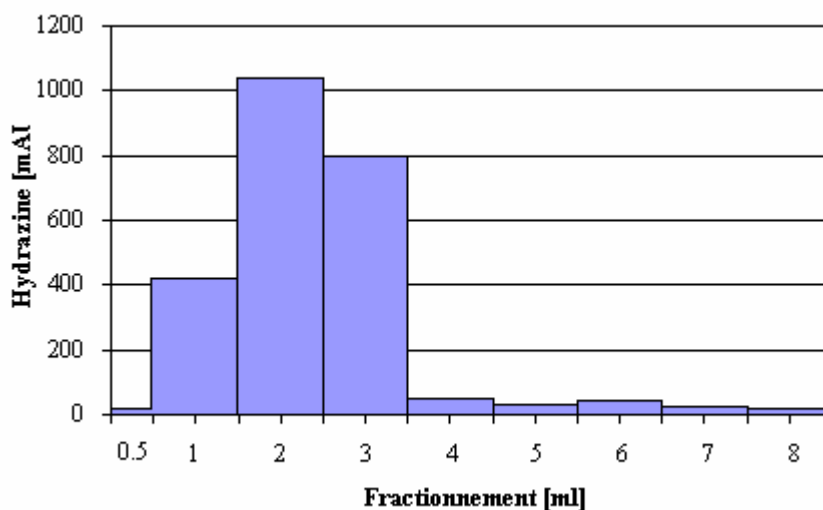


Graphique 3: Solution de carbidopa de 10 mg/ml (lot n°511-089M) à un débit de 0.6 ml/min

Les résultats bruts utilisés pour l'obtention des graphiques se trouvent en annexe 6.

3.2.2.3. Choix des fractions récoltées et détermination du recouvrement

Une solution standard correspondant à une concentration d'hydrazine de 1185 ng/ml est déposée sur la résine. Le Graphique 4 représente la quantité d'hydrazine récupérée dans les différentes fractions.



Graphique 4 : *Quantité d’hydrazine récupérée dans les différentes fractions d’une solution standard de 1185 ng/ml après passage sur une cartouche Alltech IC-OH*

Le détail des résultats se trouve en annexe 7.

L’hydrazine totale récupérée dans les trois premiers millilitres représente une surface de 2254 mAU×s. La même solution standard préparée de la même manière mais sans passage sur résine représente une aire de 3000 mAU×s.

3.2.2.4. Dosage de l’hydrazine dans différents lots de carbidopa

Le tableau suivant exprime la quantité d’hydrazine quantifiée dans différents lots de carbidopa.

Tableau 6 : *Quantification de l’hydrazine dans différents lots de carbidopa lorsque la charge est de 1 méq.*

Lot de carbidopa	Concentration de la solution de carbidopa [mg/ml]	Hydrazine [ppm]
511-089M	10	40
701-104M	51	58
701-104M	33	58
701-104	50	29
706-115	33	2.6
710-116	33	5.1

3.3. La dérivation

Une catalyse acide est nécessaire au bon fonctionnement de la dérivation. Pour assurer un rendement optimal de cette réaction, le temps de dérivation ainsi que le pH lors de la réaction ont été étudiés. De plus, afin d'identifier le produit principal formé lors de la dérivation de la carbidopa, sans extraction sur résine, une RMN est effectuée sur le produit de dérivation synthétisé.

3.3.1. Synthèse de la carbidopa dérivée

La carbidopa ainsi que la carbidopa dérivée (point 2.3.11) ont été analysées par HPLC-UV (point 2.3.9) et par RMN ^1H .

Un nouveau pic, majoritaire, est visible en HPLC à 3.1 min lors de la dérivation de la carbidopa. La carbidopa dérivée est synthétisée, elle présente un pic principal en HPLC à 3.1 min.

L'analyse RMN ^1H pour la carbidopa et la carbidopa dérivée donnent les résultats suivants :

Carbidopa

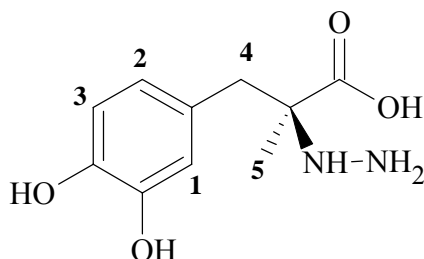


Figure 11 : Carbidopa

RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz) : 6.77 (d, $J=1.91$, H_1) ; 6.73 (d, $J=7.95$, H_3) ; 6.64 (dd, $J=1.91$, $J=7.95$) ; 3.15-2.85 (AB, $J=14.6$, H_4) ; 1.48 (s, H_5)

Carbidopa dérivée

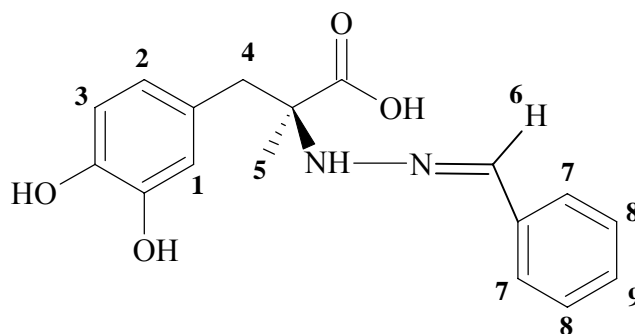


Figure 12 : Carbidopa dérivée

RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz): 8.65 (s, H_6); 7.92 (d, H_7), 7.67 (m, H_9), 7.59 (m, H_8), 6.74-6.71 (m, H_1 , H_3), 6.62-6.58 (m, H_2), 3.29 (s, H_4), 1.70 (s, H_5)

Les spectres RMN se trouvent en annexe 8.

3.3.2. Optimisation du pH nécessaire à la dérivation

Le Tableau 7 exprime l'aire obtenue pour la benzalazine lors de la dérivation de l'hydrazine à des pH différents.

Tableau 7 : Optimisation du pH nécessaire à la dérivation

pH du tampon [-]	A (PO) [mAU×s]	rsd [%]
0.8	172	15
2	209	7
3.5	206	4
5.5	189	4

Le détail des résultats se trouvent en annexe 9.

3.3.3. Optimisation du temps de dérivation

Le temps de dérivation a été varié et les aires obtenues correspondant à la benzalazine dans la phase organique sont citées dans le tableau suivant.

Tableau 8 : Optimisation du temps de dérivation

Temps de dérivation [min]	A (PO) [mAU×s]	rsd [%]
1	299	0.2
1.5	295	0.3
2	303	0.1
2.5	299	0.3

Le détail des résultats se trouvent en annexe 10.

3.4. Extraction liquide / liquide

Après dérivation, la benzalazine formée est séparée de la carbidopa par extraction liquide/liquide avec l'heptane. La benzalazine pure se présente sous la forme de petits cristaux jaunes, elle est insoluble dans les solutions aqueuses mais se solubilise facilement dans l'heptane, les alcools, l'éther, l'acétone et le benzène [24].

Pour permettre une extraction optimale de la benzalazine, le temps d'extraction est étudié.

3.4.1. Optimisation du temps de l'extraction liquide/liquide

Le temps d'extraction a été étudié entre 1 et 2.5 minutes. Le tableau suivant exprime le pourcentage de benzalazine extraite dans la phase organique par rapport à la benzalazine totale, soit celle contenue dans la phase aqueuse et organique.

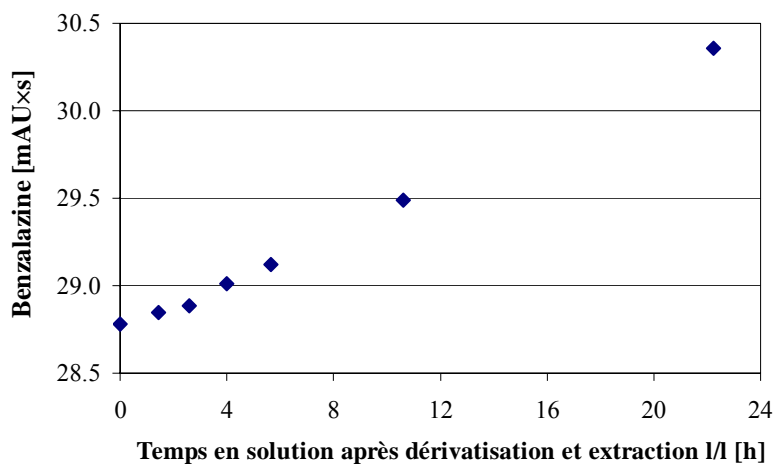
Tableau 9 : Efficacité de l'extraction liquide/liquide en fonction du temps d'extraction

Temps d'extraction [min]	Extraction l/l [%]	rsd [%]
1	96.4	0.6
1.5	98.9	1.0
2	98.4	0.5
2.5	98.4	0.2

Le détail des résultats se trouve en annexe 11.

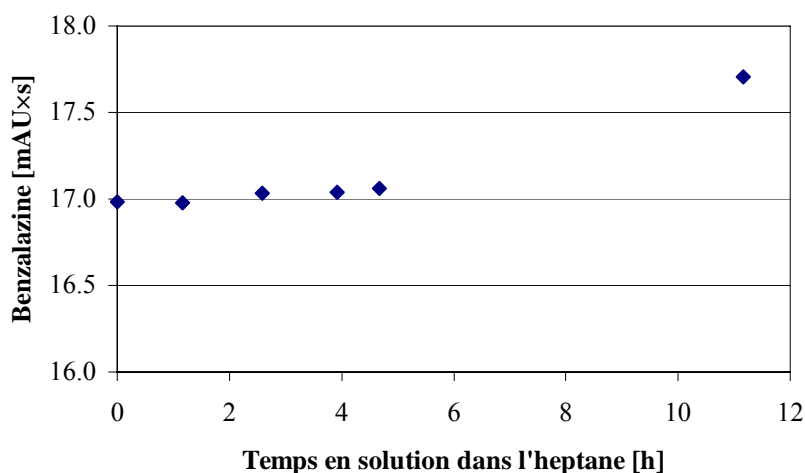
3.4.2. Stabilité d'une solution dérivatisée après extraction l/l

La phase organique obtenue après dérivation et extraction l/l lors de la quantification de l'hydrazine dans le lot de carbidopa n°701-104 a été injectée à des temps différents. La stabilité de la benzalazine dans la phase organique en fonction du temps est observable dans le Graphique 5.



Graphique 5 : Stabilité de l'hydrazine dérivatisée dans l'heptane

Le graphique ci-dessous représente la stabilité d'une solution de benzalazine 3.5 µg/ml en fonction du temps. La benzalazine est dissoute telle quelle dans l'heptane.



Graphique 6 : Stabilité d'une solution de benzalazine 3.5 µg/ml

Les valeurs exactes correspondant à ces graphiques se trouvent en annexe 12.

3.5. La validation

3.5.1. La spécificité

Les chromatogrammes représentant l'heptane (Figure 13), la benzaldéhyde (Figure 14), un blanc (Figure 15), un standard (Figure 16) ainsi qu'un échantillon de carbidopa (Figure 17) permettent de visualiser la spécificité de la méthode

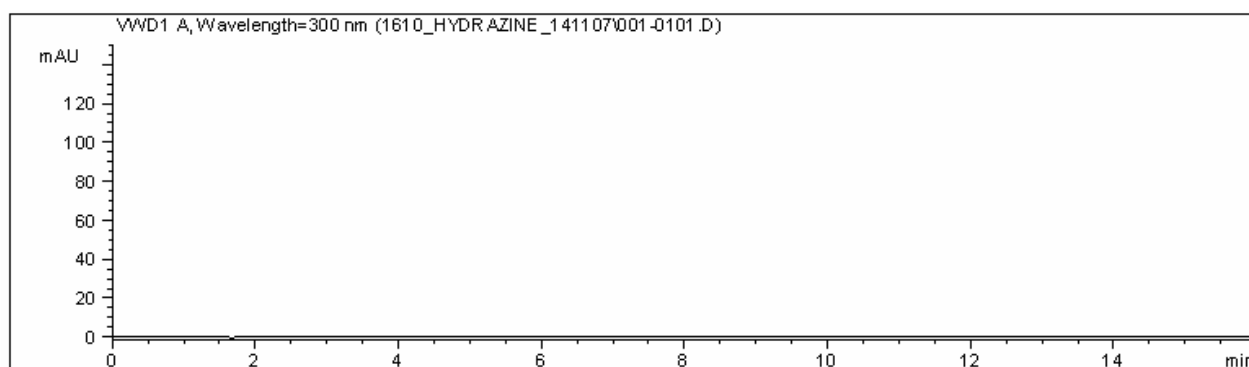


Figure 13 : Chromatogramme représentant l'heptane

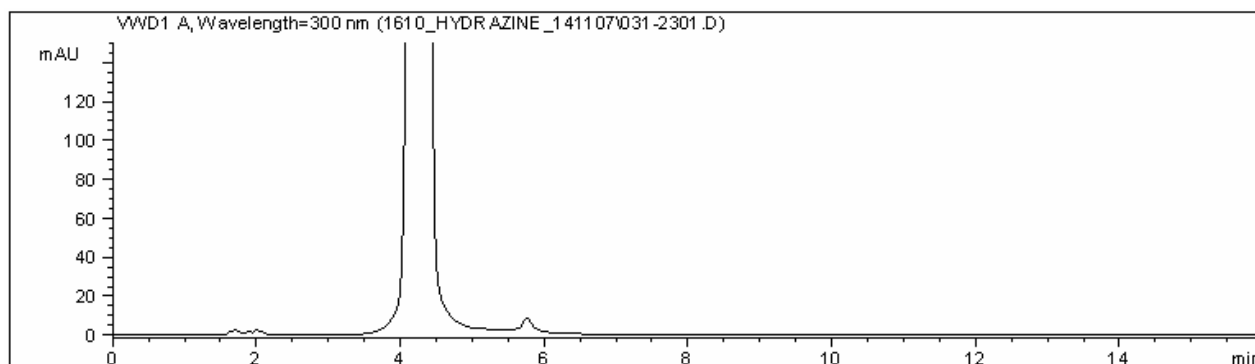


Figure 14 : Chromatogramme représentant la benzaldéhyde

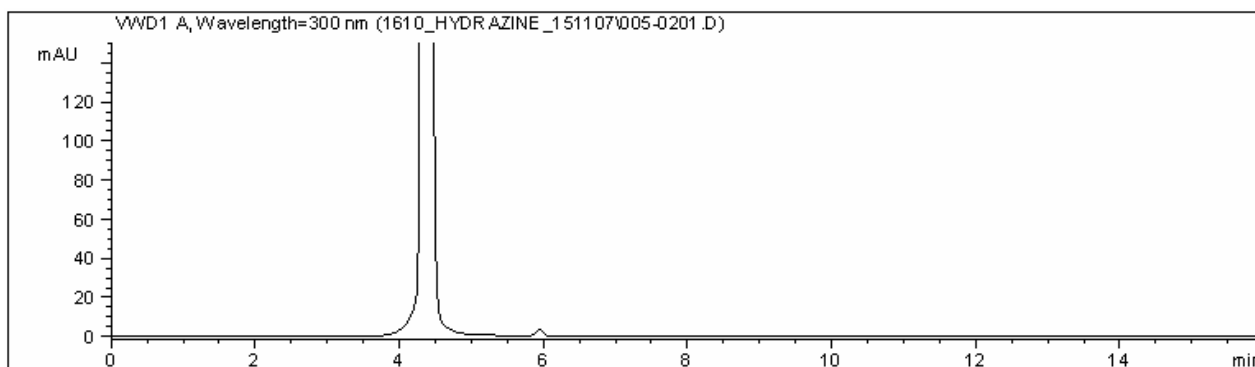


Figure 15 : Chromatogramme représentant le blanc

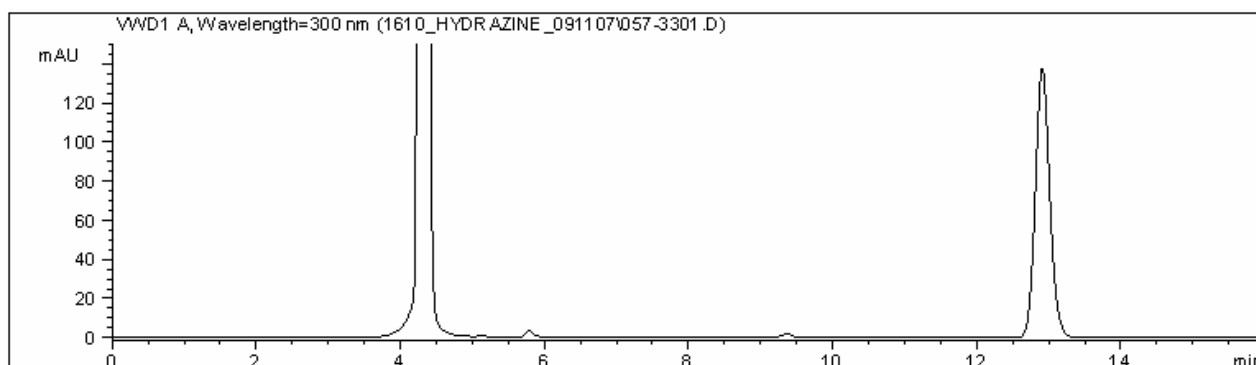


Figure 16 : Chromatogramme représentant une solution standard correspondant à une concentration d'hydrazine de 2076 ng/ml

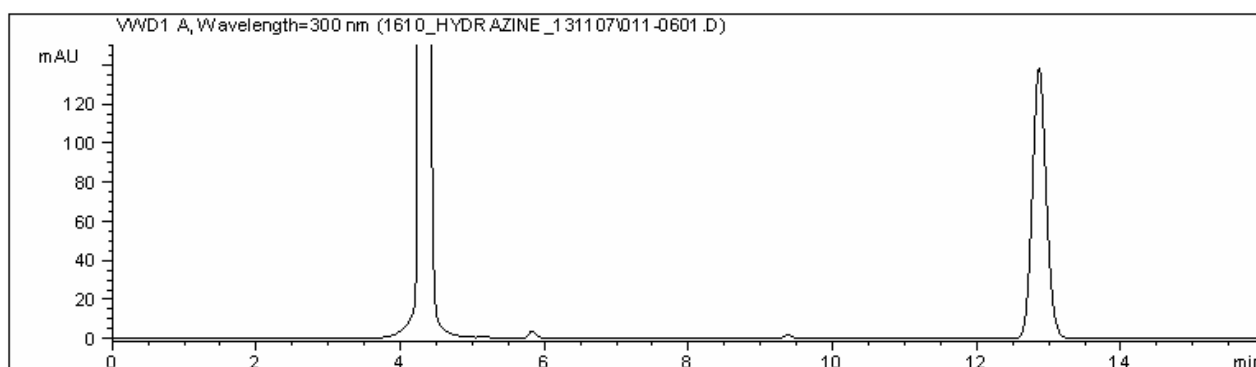


Figure 17 : Chromatogramme représentant une solution de carbidopa (lot n° 701-104M)

Le tableau ci-dessous exprime le temps de rétention relatif à chaque substance et la résolution entre la benzalazine et la benzaldéhyde calculée par la méthode des tangentes.

Tableau 10 : Temps de rétention et résolution des substances permettant de déterminer la spécificité

Substance	t_R [min]	Résolution [-]
Heptane	nd	-
Benzaldéhyde	4.2	-
Blanc	4.3	-
Benzalazine (standard)	12.9	33
Benzalazine (carbidopa)	12.9	-

3.5.2. La fidélité

La répétabilité est effectuée sur une série de cinq mesures d'une solution standard et cinq mesures d'une solution de carbidopa (lot n°706-115).

Le tableau suivant exprime, pour chaque essai, les aires mesurées pour la benzalazine lors de la préparation du standard et l'hydrazine contenue dans l'échantillon de carbidopa. La moyenne des essais ainsi que l'écart type relatif sont donnés pour chaque série. Le détail des résultats se trouve en annexe 13.

Tableau 11 : Résultats de la répétabilité sur un standard et un échantillon de carbidopa (lot n°706-115)

Essai n°	Benzalazine dans le standard	Hydrazine dans le carbidopa
	[mAU×s]	[ppm]
1	951	2.3
2	960	2.6
3	893	2.4
4	952	2.4
5	934	2.8
Moyenne	938	2.5
Ecart type (s)	27	0.19
rsd [%]	2.8	7.5

L'intervalle de confiance à 95 % sur une solution standard et un échantillon de carbidopa sont de respectivement 938 ± 33 mAU×s et 2.5 ± 0.23 ppm.

La répétabilité intermédiaire, quant à elle, est effectuée sur une solution de carbidopa (lot 706-115), en variant le maximum de paramètres.

Pour trois groupes de mesures et cinq mesures par groupe, la valeur critique relevée dans la table de Cochran, pour un niveau de signification de 0.01, est $g_{0.01} = 0.8335$ [22]. La valeur de g calculée avec les trois séries effectuées atteint 0.8142 (annexe 14). Cette valeur est inférieure à la valeur critique de la table.

Tableau 12 : Détermination de l'écart type relatif de la fidélité intermédiaire

L1, X1, J1	L2, X2, J2	L3, X3, J3
95.7	108.6	86.4
101.4	106.7	93.8
97.5	92.1	79.8
96.6	94.2	124.2
108.9	98.4	115.8
$(s_1)^2 = 5.4$	$(s_2)^2 = 7.4$	$(s_3)^2 = 19.2$
Moyenne pour n = 15		100.0 %
Variance $s^2 = (s_1^2 + s_2^2 + s_3^2)/3$		150.2 %
Ecart type (s)		11.3 %
rsd		11.3 % < 20 %

Où : Ln : laboratoire
 Xn : opérateur
 Jn : jour

L'ICH admet un écart type relative de 20 % pour le dosage des teneurs inférieures à 1 %.

Le détail des calculs se trouvent en annexe 14.

3.5.3. L'exactitude

L'exactitude est déterminée sur un intervalle de concentration de 10 à 26 ppm pour un échantillon de carbidopa de 32 ng/ml. Elle est représentée par le tableau suivant et les résultats détaillés se trouvent en annexe 15.

Tableau 13 : Taux de recouvrement

Xa^{a)} [ppm]	Xm^{b)} [ppm]	Recouvrement [%]	Xd^{c)} [%]	Norme [%]
26	29	113	13	<20
15	16	107	7.4	<20
10	12	113	14	<20

a) Xa : concentration en hydrazine calculée d'après la pesée

b) Xm : concentration en hydrazine mesurée d'après l'analyse

c) Xd : exactitude

L'intervalle de confiance du taux de recouvrement est de 110.6 ± 8.9 % pour un écart type de 3.6 % à une probabilité de 95 % sur 3 essais.

3.5.4. La limite de détection

La limite de détection est déterminée par l'équation 3 et la limite de détection est fixée à une concentration d'hydrazine de 0.50 ng/ml.

Le chromatogramme utilisé pour la détermination de la limite de détection se trouve en annexe 16.

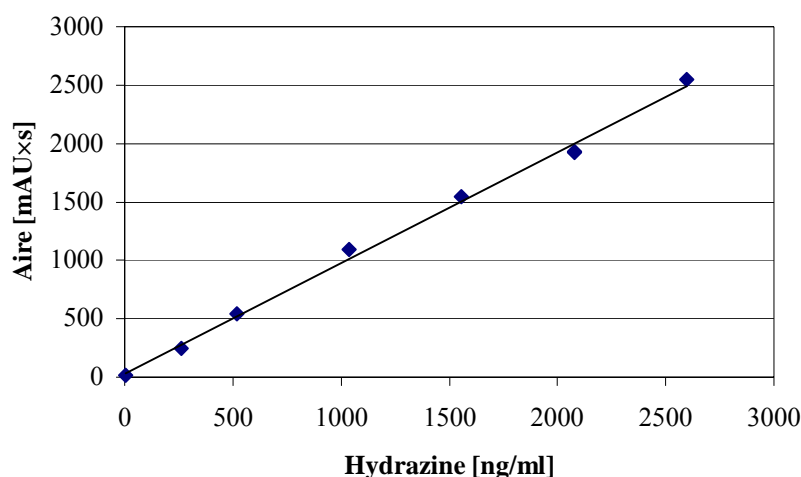
3.5.5. La limite de quantification

La limite de quantification est déterminée par l'équation 4 et la limite de quantification est arrondie à une concentration d'hydrazine de 2.5 ng/ml.

Après sept injections de cette solution, la moyenne des aires obtenue est de 5.3 avec un écart type relatif de 5.2 %. Le détail des résultats se trouve en annexe 17.

3.5.6. La linéarité

La linéarité est obtenue à partir de sept solutions standard et la droite obtenue est représentée ci-dessous.



Graphique 7 : Droite de calibration

L'équation de la droite est $\text{aire} = 0.9587 \times \text{conc. hydrazine} + 27.828$ avec un coefficient de détermination de $R^2 = 0.9966$. Les valeurs utilisées pour créer la droite se trouvent en annexe 18.

4. DISCUSSION

4.1. Solubilisation et stabilité de la carbidopa

La carbidopa peu soluble dans l'eau, très peu soluble dans l'alcool, pratiquement insoluble dans le chlorure de méthylène [26] Par contre, elle se solubilise facilement dans une solution très acide ou très basique.

Toutefois, la carbidopa est dégradée par une solution de NaOH et la solution devient rouge vif. Cette observation permettrait de penser que la carbidopa formerait des phénolates, composés très colorés (Figure 18).

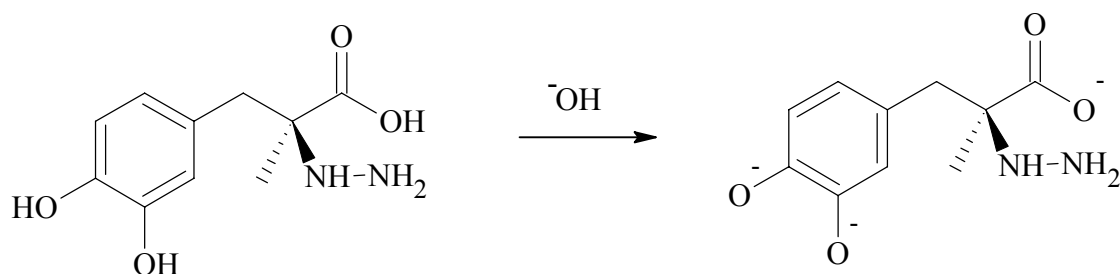


Figure 18 : Formation de phénolate à partir de la carbidopa

Lorsque la carbidopa est solubilisé en milieu acide, la solution devient jaune avec le temps. En effet, la carbidopa est sensible à la lumière [26] et peut former des quinones lors de son exposition à la lumière et en présence d'oxygène, comme décrit dans la figure suivante.

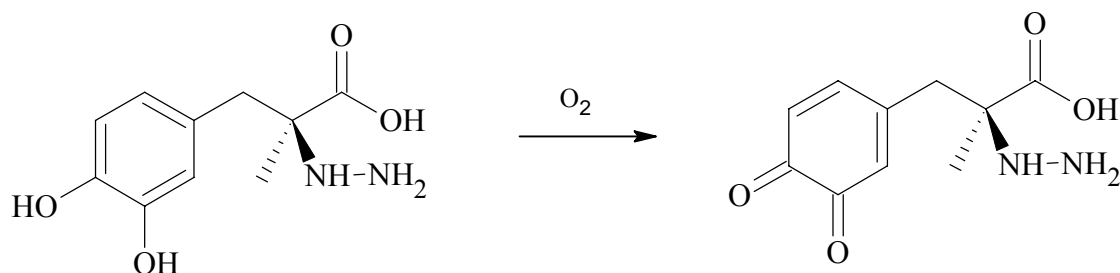


Figure 19 : Formation d'une quinone à partir de la carbidopa.

De plus, la carbidopa n'est par contre pas stable en solution acide et se dégrade lentement pour former de l'hydrazine et de la DHPA

La carbidopa se dégrade aussi en hydrazine et DHPA lorsqu'elle est soumise à une oxydation [27]. Une hypothèse du mécanisme de dégradation de la carbidopa pourrait être expliquée par le mécanisme décrit par la Figure 20. La carbidopa subit d'abord une oxydation pour former un diimine qui est un composé instable, puis une décarboxylation et une hydrolyse.

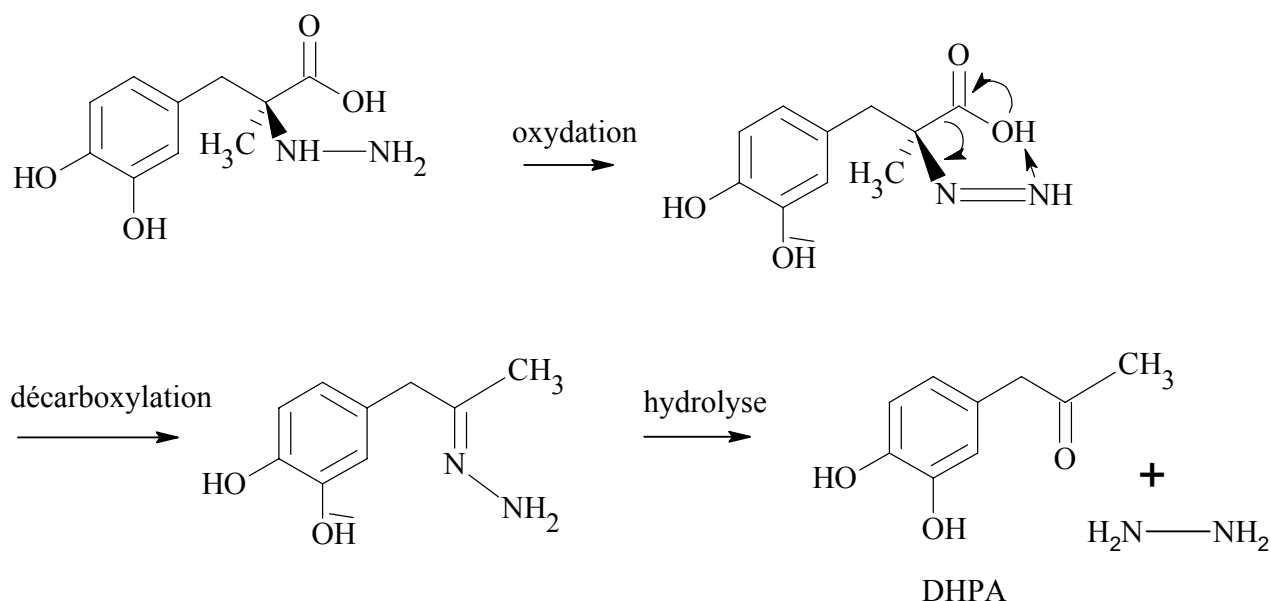


Figure 20 : Hypothèse de dégradation de la carbidopa en DHPA et hydrazine

L'oxydation nécessite la présence d'un oxydant tels que des hypochlorites ou l'oxygène catalysée par un métal. Le métal pourrait provenir de la carbidopa. En effet, la Pharmacopée Européenne exige la quantification des métaux lourds et tolère leur teneur jusqu'à 20 ppm.

4.2. Extraction sur résine

Pour éviter la dégradation de la carbidopa lors de la dérivatisation, la carbidopa est extraite sur résine échangeuse d'anions. Plusieurs résines, en vrac ou sous forme de cartouches, ont été testées. Pour vérifier l'efficacité de ces dernières, la carbidopa non retenue se trouvant dans le filtrat est dosée par HPLC (2.3.9).

4.2.1. Extraction de la carbidopa sur résine, en mode batch

Le Tableau 2 permet de conclure que la répétabilité de la rétention de la carbidopa n'est pas garantie. Cependant l'analyse RMN démontre que le produit majoritaire de la carbidopa dérivatisée n'est pas la benzalazine mais la carbidopa dérivatisée (point 3.3.1). Une petite quantité de carbidopa présente dans la solution lors de la dérivatisation ne pourrait donc pas gêner la quantification de l'hydrazine, si la dérivatisation et l'extraction liquide/liquide se font rapidement.

Les meilleures conditions pour l'extraction de la carbidopa sont les suivantes : La carbidopa est extraite pendant deux minutes sur deux grammes de résine.

Les résultats du Tableau 3 permettent de conclure que l'azote n'a aucun effet direct sur l'hydrazine. Par contre, le Tableau 4 démontre la nécessité de l'atmosphère inerte lors de l'extraction de la carbidopa sur la résine. En effet, la répétabilité intermédiaire est nettement moins bonne lorsque la résine se trouve en contact avec l'air. L'hydrazine quantifiée lorsque la résine est

exposée à l'air est plus de dix fois inférieure à l'hydrazine quantifiée en présence d'azote. L'hydrazine se dégraderait alors en présence d'air, lors de sa mise en contact avec la résine basique. L'aire de la phase organique de la solution de sulfate d'hydrazine sans azote est de 563 mAU×s avec un écart type relatif de 150 %. Cette valeur est la moyenne de trois valeurs complètement dispersées avec des valeurs allant de 9 à 1539 mAU×s. Les valeurs élevées ne sont pas expliquées, par contre, ceci conforte l'idée qu'une atmosphère inerte est donc indispensable au bon fonctionnement de la préparation de l'échantillon.

La linéarité de la benzalazine exprimée par le Graphique 1 est bonne, la droite présente un coefficient de détermination de $R^2 = 0.9996$. La répétabilité est satisfaisante aussi bien pour le standard que pour l'échantillon de carbidopa qui présentent un écart type relatif de respectivement 4 et 2 %.

4.2.2. Extraction de la carbidopa sur cartouches de résine

Le Tableau 5 exprime clairement la haute efficacité de la cartouche Alltech IC-OH par rapport aux autres cartouches. Le choix s'est donc porté sur ce type de cartouche.

La résine Alltech, étant une résine de type 1, serait assez basique pour permettre la déprotonation de la carbidopa et pour la retenir.

Le débit d'élution sur la cartouche est optimisé à 0.6 ml/min. En effet, à ce débit, 84 % de l'hydrazine quantifiée sur les neuf fractions récoltées se trouve dans les trois premiers millilitres (Graphique 3). Comme une dégradation constante de la carbidopa sur la résine est observée, l'hydrazine présente dans les fractions suivantes est considérée comme n'étant pas de l'hydrazine résiduelle de synthèse. Chaque fraction dégradée correspond à environ 0.5 ppm d'hydrazine.

Le Graphique 4 permet de conclure que la majorité de l'hydrazine est contenue entre 0.5 et 3 ml.

La comparaison d'un standard dérivatisé, avec et sans passage sur résine, permet de conclure que l'hydrazine semble être retenue par la résine. En effet, seulement 75.2 % de l'hydrazine déposée est récupérée entre 0.5 et 3 ml. Cependant, après le passage de 6 ml d'eau supplémentaires, le pourcentage d'hydrazine récoltée atteint seulement 79.8 %.

Il n'est pas avantageux de récolter 3 % en plus de standard et de prendre le risque de dégrader davantage la carbidopa. Les fractions récoltées sont fixées entre 0.5 et 3 ml.

La solution de carbidopa devrait contenir le minimum d'acide chlorhydrique nécessaire à la dissolution de la carbidopa. En effet, le HCl est lui aussi échangé sur la résine et occupe des sites qui ne pourront pas retenir la carbidopa. De plus, l'acide chlorhydrique a une meilleure affinité avec la résine que la carbidopa. Celle-ci est décrochée par le HCl lorsque la résine est surchargée.

Lorsque l'échantillon de carbidopa est préparé selon la méthode décrite au point 2.3.1, les deux millilitres déposés sur la résine correspondent environ à 1 méq et la cartouche à une capacité de 1.5 méq.

4.2.3. Comparaison des deux méthodes d'extraction

L'extraction de la carbidopa avec la résine en mode batch et sous forme de cartouche démontre des résultats reproductibles.

Cependant, un même lot de carbidopa contiendrait 42 ppm (point 3.2.2.4) d'après les résultats de l'analyse effectuée avec les cartouches Alltech, alors que la méthode utilisant la résine en mode batch abouti à une teneur de 52 ppm en moyenne (point 3.2.1.4).

Ce point faible de la méthode « batch » pourrait être expliqué par le fait que la carbidopa se dégraderait plus facilement dans les conditions d'analyse en mode batch. De plus, la carbidopa n'étant pas complètement extraite, une petite partie de cette carbidopa non-extraite pourrait se dégrader et former de l'hydrazine.

La carbidopa ne peut pas être extraite à 100 % sur une résine en mode batch. En effet, le processus d'échange d'ions peut être considéré comme un équilibre chimique. Pour réduire la quantité de carbidopa non extraite, il faudrait appliquer deux passages consécutifs sur la résine. Ce phénomène est observé sur la cartouche. En effet, la solution élue sur la cartouche et la concentration en carbidopa de la solution élue évolue tout au long de la résine.

Les essais suivants et la validation sont effectués d'après la méthode utilisant la résine Alltech (point 2.3.4).

4.3. **Extraction sur résine**

4.3.1. Synthèse de la carbidopa dérivatisée

L'analyse RMN permet de confirmer que le produit principal formé lors de la dérivatisation de la carbidopa est la carbidopa dérivatisée et non l'hydrazine. Cependant, si la carbidopa n'est pas extraite du tout, la petite quantité de carbidopa qui largue de l'hydrazine suffit pour atteindre largement les 20 ppm autorisés par la Pharmacopée Européenne.

4.3.2. Optimisation du pH lors de la dérivatisation

Les écarts types cités dans le Tableau 7 permettent de conclure que le pH fixé entre 2 et 5.5 a peu d'influence sur le résultat. Cependant, la dérivatisation est moins reproductible à pH 0.8. Ce résultat peut être expliqué par le fait que l'hydrazine se protone à partir d'un certain pH et perd son caractère nucléophile.

Le pH lors de la dérivatisation est alors fixé à 5.5, de manière à obtenir des résultats reproductibles.

4.3.3. Optimisation du temps de d\u00e9rivatisation

Le temps de d\u00e9rivatisation a \u00e9t\u00e9 \u00e9tudi\u00e9 entre 1 et 2.5 minutes. Chaque temps donne un r\u00e9sultat reproductible avec un \u00e9cart type relatif inf\u00e9rieur ou \u00e9gal \u00e0 0.3 %. L'\u00e9cart type relatif entre les aires obtenus de tous les essais rassembl\u00e9s atteint 1.1 %. La dur\u00e9e de d\u00e9rivatisation peut donc se situer entre 1 et 2.5 minutes, sans avoir d'influence sur le r\u00e9sultat.

Pour traiter chaque essai de mani\u00e8re identique, le temps de d\u00e9rivatisation a \u00e9t\u00e9 fix\u00e9 \u00e0 2 minutes.

4.4. **L'extraction liquide/liquide**

4.4.1. Optimisation du temps d'extraction

Le temps d'extraction joue un r\u00f4le important. En effet, le pourcentage de benzalazine contenu dans la phase organique, par rapport \u00e0 la benzalazine totale est sup\u00e9rieur \u00e0 98 % \u00e0 partir d'un temps d'extraction de 1.5 minutes. Par mesure de s\u00e9curit\u00e9 et pour garantir une bonne r\u00e9p\u00e9tabilit\u00e9 interm\u00e9diaire de l'extraction, le temps est fix\u00e9 \u00e0 2 minutes.

Le Graphique 5 permet d'appr\u00e9cier la stabilit\u00e9 d'une solution d'hydrazine dans l'heptane, donc apr\u00e8s d\u00e9rivatisation et extraction. La concentration en benzalazine augmente lentement avec le temps. Par contre, le Graphique 6 repr\u00e9sentant une solution de benzalazine dans l'heptane (la benzalazine est pes\u00e9e et dissoute) d\u00e9montre une meilleure stabilit\u00e9 de la benzalazine.

Ceci laisse supposer que la r\u00e9action de d\u00e9rivatisation continue lentement dans la phase organique.

Les solutions devraient donc id\u00e9alement \u00eatre analys\u00e9es directement apr\u00e8s leur pr\u00e9paration. Cependant, une erreur de 1 % est acceptable et permettrait de stocker les solutions pendant environ 3 heures.

4.5. **La validation**

4.5.1. La sp\u00e9cificit\u00e9

La comparaison des temps de r\u00e9tention de la benzalazine avec l'heptane, la benzald\u00e9hyde et le blanc permettent d'affirmer que le pic de la benzalazine est bien s\u00e9par\u00e9 avec une r\u00e9solution sup\u00e9rieure \u00e0 2.

Le pic observ\u00e9 \u00e0 12.9 minute est donc la benzalazine.

4.5.2. La fidélité

La répétabilité intermédiaire obtenue sur le standard ($s = 2.8$) et sur l'échantillon de carbidopa ($s = 7.5$) sont bonnes. L'échantillon de carbidopa présente un écart-type relatif supérieur à celui du standard. La dégradation de la carbidopa sur la résine peut expliquer ce phénomène. En effet, la rapidité de l'élution effectuée manuellement ne permet pas d'assurer un débit tout à fait constant et la dégradation de la carbidopa est influencée par le temps passé sur la résine. La quantité de carbidopa dégradée n'est donc pas constante et influence le résultat.

La répétabilité est vérifiée à l'aide du test de Cochran et la valeur critique de la table est supérieure à la valeur calculée. Pour une probabilité de 99 %, l'ensemble des variances peut être considérée comme homogène.

La fidélité de la méthode (répétabilité et répétabilité intermédiaire) est bonne compte tenu des écarts types relatifs de répétabilité et de répétabilité intermédiaire ($< 20\%$).

4.5.3. L'exactitude

Le taux de recouvrement moyen par rapport à la quantité à doser est de 111.5 % sur l'intervalle allant de 10 à 26 ppm pour une concentration en carbidopa d'environ 32 mg/ml.

Le taux de recouvrement est supérieur à 100 % dû à la dégradation de la carbidopa. Ce recouvrement permet d'avoir une marge de sécurité. En effet, un lot de carbidopa quantifié à 20 ppm sera inférieur ou égal à 20 ppm et la limite fixée par la Pharmacopée ne sera ne aucun cas dépassée.

4.5.4. La limite de détection et de quantification

Les limites de détection et de quantification sont suffisamment basses et permettent de doser très facilement une concentration en hydrazine très inférieure à 20 ppm dans une solution de carbidopa de 32 mg/ml.

4.5.5. La linéarité

La surface de réponse de la benzalazine est proportionnelle à la concentration selon une relation linéaire ($R^2 = 0.9966$) sur un domaine allant de 5 à 2500 ng/ml pour la concentration relative à l'hydrazine.

5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Lors de ce travail, une méthode pour la quantification de l'hydrazine dans la carbidopa a été développée, optimisée et validée. La validation a permis d'affirmer la linéarité, la fidélité et l'exactitude de la méthode.

Cependant, la répétabilité intermédiaire pourrait être améliorée. En effet, l'élution régulière de la solution est difficile à gérer manuellement. Il serait donc judicieux d'utiliser une chambre à vide qui permettrait d'obtenir ainsi un débit constant.

L'hydrazine a été quantifiée dans différents lots de carbidopa certains de ces lots présentent une teneur en hydrazine nettement supérieure à la valeur limite supérieure fixée par la Pharmacopée Européenne, soit 20 ppm. Toutefois, les derniers lots synthétisés contiennent moins de 6 ppm d'hydrazine.

Il serait intéressant de suivre la stabilité de la carbidopa en stock par une quantification régulière de l'hydrazine. De plus, une éventuelle conséquence de la micronisation sur la formation d'hydrazine pourrait être étudiée. En effet, deux échantillons provenant d'un même lot, mais dont la granulométrie est différente, ne présentent pas la même teneur en hydrazine. L'échantillon non-micronisé contient 29 ppm d'hydrazine alors que le micronisé atteint 59 ppm.

Cette méthode est appropriée pour doser l'hydrazine dans la carbidopa. Elle est plus spécifique, plus fidèle et plus exacte que la méthode CCM proposée par la monographie de la Pharmacopée Européenne. Une amélioration potentielle de cette méthode consiste à trouver des conditions optimales pour ralentir d'une façon significative la dégradation de la carbidopa.

6. REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr. Ezzeddine Ben-Rayana pour m'avoir proposé ce sujet de travail de diplôme et pour sa disponibilité tout au long de ces trois mois. Merci au Dr. Urban Frey pour avoir toujours répondu présent lorsqu'une mise au point était nécessaire.

Je tiens aussi à remercier Maud Fellay pour son soutien et pour l'intérêt porté à ce travail. Un tout grand merci à Sophie Megevand pour les analyses RMN et pour avoir si gentiment répondu à toutes mes questions de chimie organique. Merci à Karine Avanthey et à Nadia Delfauro pour avoir accepté d'appliquer la méthode sur la reproductibilité intermédiaire. Merci à Flavien Vannay pour la bonne ambiance de labo et pour sa bonne humeur.

Je tiens aussi à remercier toute l'équipe du QC pour les moments partagés et pour leur soutien tout au long de ces trois mois.

Enfin, un grand merci à Annetta Hartmann pour la relecture du rapport et pour son irremplaçable amitié ainsi qu'à ma famille pour son indispensable soutien.

Je remercie aussi les fournisseurs Macherey-Nagel, Dionex, Waters et Alltech pour m'avoir fourni des échantillons de cartouches pour les essais.

Sion, le 23 novembre 2007

Joëlle Quiquerez

7. BIBLIOGRAPHIE

- [1] T. Kean and al., Acceptance Criteria for Levels of Hydrazine in Substances for Pharmaceutical Use and Analytical Methods for its Determination, Pharmeuropa Scientific Notes 2, (2006) 23-33
- [2] Club des pharmaciens animateurs de Suisse, Vademecum Cap IV, Club des pharmaciens animateurs de Suisse, (1996) 362-363
- [3] Methods for the Determination of Hazardous Substances, Hydrazine in air 86 (1997)
- [4] INERIS, Emissions accidentelles de substances chimiques dangereuses dans l'atmosphère, Hydrazine, (2003) 1-2
- [5] P. Ortega-Barrales and al., Solid-phase spectrophotometric determination of trace amounts of hydrazine at sub-ng ml⁻¹ level, Analytica Chimica Acta 353, (1997) 115-122
- [6] U.S Department of Labors, Hydrazine, www.osha.gov (04.10.2007)
- [7] Interscan corporation, <http://www.gasdetection.com/TECH/hydrazine.html>, (04.06.2007)
- [8] Carbidopa, monographie 0755, Pharmacopée Européenne 5.0, (2005) 1268
- [9] J. Quiquerez, Méthodes utilisées pour le dosage de l'hydrazine dans le carbidopa, HES-SO Sion (2007)
- [10] N. H. Jagota, Determination of trace levels of hydrazine in the penultimate intermediate of a novel anit-infective agent, J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 16 (1998) 1083-1087
- [11] O. Gyllenhaal, Determination of hydrazine in hydralazine by capillary gas chromatography with nitrogen-selective detection after benzaldéhyde dérivatisation, J. of Chromatography A 511, (1990) 303-316
- [12] A. Carlin, N. Gregory and J. Simmons, Stability of isoniazid in isoniazid syrup: formation or hydrazine, J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 17, (1988) 885-890
- [13] J. Remenar and al, Pharmaceutical compositions and method of using levodopa and carbidopa, World Intellectual Property Organization 099678, (2005) 1-64
- [14] C.E. Harland, Ion Exchange: Theory and Practice, 2nd edition, Royal Society and Chemistry Paperbacks, UK (1994)
- [15] Macherey-Nagel, Sokid Phase Extraction, Application Guide (2007)
- [16] F. de Dardel, Echange d'ions, principes de base, ETI Sciences et Techniques J 2-783, (1998) 1-17
- [17] Alltech Associates, IC-OH and IC-OH Plus Devices, Data Sheet 30262 U (2007)
- [18] M. Feinberg, Validation des méthodes d'analyse, Dunod, Paris (2004)

- [19] Belac, Critères auxquels doivent répondre les laboratoires accrédités demandeurs d'un domaine d'application flexible pour les analyses de résidus de pesticides dans les produits (2006)
- [20] European Medicines Agency, ICH Topic Q 2 (R1), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (1995)
- [21] Science and Fun, <http://www.chem.wisc.edu/areas/reich/Handouts/nmr/NMR-Solvents.htm> (19.11.2007)
- [22] J. Fleury, Introduction à l'usage des méthodes statistiques en pharmacie (1987)
- [23] Fisher and Yates, Statistical Tables for Biological Agricultural and Medical Research, 6th edition, Longman, London (1963) 46
- [24] Handbook of Chemistry and Physics, 69th edition, CRC Press (1988-1989)
- [25] The Merck Index, ninth edition, Merck & co., Inc., USA, (1976)
- [26] Pharmacopée Européenne 5.0, 5^{ème} édition, tome 2, Edom (2004)
- [27] P. Tömpe, A.N. Halbauer, L. Ladanyi., Electrochemical study of the oxidation of carbidopa and its determination using liquid chromatography with electrochemical detection, Analytica chimica acta ,vol. 273, (1993) 391-398

8. ANNEXES

- Annexe 1 : Droite de calibration de la carbidopa
- Annexe 2 : Extraction sur résine Dowex
- Annexe 3 : Effet de l'azote et de l'air sur une solution standard, avec et sans résine Dowex
- Annexe 4 : Résine Dowex : Linéarité
- Annexe 5 : Résine Dowex : Répétabilité d'une solution standard et d'une solution de carbidopa
- Annexe 6 : Cartouche Alltech IC-OH : Variation du débit
- Annexe 7 : Cartouche Alltech IC-OH : Standard
- Annexe 8 : Spectre RMN ¹H de la carbidopa et de la carbidopa dérivatisée
- Annexe 9 : Dérivatisation de l'hydrazine à des pH différents
- Annexe 10 : Optimisation du temps de dérivatisation
- Annexe 11 : Optimisation du temps d'extraction liquide/liquide
- Annexe 12 : Stabilité de la benzalazine
- Annexe 13 : Cartouche Alltech IC-OH : Répétabilité
- Annexe 14 : Cartouche Alltech IC-OH : Répétabilité intermédiaire
- Annexe 15 : Cartouche Alltech IC-OH : Exactitude
- Annexe 16 : Cartouche Alltech IC-OH : Limite de détection, chromatogramme permettant la détermination de la limite de détection
- Annexe 17 : Cartouche Alltech IC-OH : Limite de quantification
- Annexe 18 : Cartouche Alltech IC-OH : Calibration